

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-520000

(P2002-520000A)

(43) 公表日 平成14年7月9日(2002.7.9)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード <sup>*</sup> (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 31/711	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/711		39/00	H 4 C 0 8 5
		39/00	4 C 0 8 6
		39/12	
		39/21	
		39/21	
		39/29	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全160頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2000-548449(P2000-548449)	(71) 出願人	エビミュン、 インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成11年5月13日(1999.5.13)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121,
(85) 補正文提出日	平成12年11月10日(2000.11.10)		サン ディエゴ, ナンシー リッジ
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 9 / 1 0 6 4 6		ドライブ 5820, スイート 100
(87) 国際公開番号	W O 9 9 / 5 8 6 5 8	(72) 発明者	ファイクス, ジョン ディー,
(87) 国際公開日	平成11年11月18日(1999.11.18)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 92122,
(31) 優先権主張番号	0 9 / 0 7 8 , 9 0 4		サン ディエゴ, リップマン ストリート 6474
(32) 優先日	平成10年5月13日(1998.5.13)	(72) 発明者	ハーマンソン, ゲイリー ジー,
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 92024,
(31) 優先権主張番号	6 0 / 0 8 5 , 7 5 1		エンシニタス, ビア デ カパロ
(32) 優先日	平成10年5月15日(1998.5.15)		3159
(33) 優先権主張国	米国 (U S)	(74) 代理人	弁理士 山本 秀策
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 免疫応答を刺激するための発現ベクターおよびそのベクターの使用方法

## (57) 【要約】

本発明は、複数の C T L エピトープおよび H T L エピトープ、ならびに M H C 標的化配列をコードする核酸ワクテンに關する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 主要組織適合性(MHC)標的化配列をコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターであって、該第1のヌクレオチド配列は2つ以上の異種ペプチドエピトープをコードする第2のヌクレオチド配列に融合され、ここで該異種ペプチドエピトープは、2つのHTLペプチドエピトープまたはCTLペプチドエピトープおよびユニバーサルHTLペプチドエピトープを含む、ベクター。

【請求項2】 前記異種ペプチドエピトープが2つ以上の異種HTLペプチドエピトープを含む、請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項3】 前記異種ペプチドエピトープがCTLペプチドエピトープおよびユニバーサルHTLペプチドエピトープを含む、請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項4】 前記異種ペプチドエピトープがさらに1つ以上のCTLペプチドエピトープを含む、請求項2に記載の発現ベクター。

【請求項5】 前記異種ペプチドエピトープがさらに2つ以上のCTLペプチドエピトープを含む、請求項3に記載の発現ベクター。

【請求項6】 前記異種ペプチドエピトープがさらに2つ以上のHTLペプチドエピトープを含む、請求項3に記載の発現ベクター。

【請求項7】 前記HTLペプチドエピトープの1つがユニバーサルHTLエピトープである、請求項2に記載の発現ベクター。

【請求項8】 前記ユニバーサルHTLエピトープが汎DRエピトープである、請求項3または7に記載の発現ベクター。

【請求項9】 前記汎DRエピトープが、配列AlaLysPheValAlaAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla(配列番号38)を有する、請求項8に記載の発現ベクター。

【請求項10】 前記ペプチドエピトープが、B型肝炎ウイルスエピトープ、C型肝炎ウイルスエピトープ、ヒト免疫不全ウイルスエピトープ、ヒトパピローマウイルスエピトープ、MAGEエピトープ、PSAエピトープ、PSMエピトープ、PAPエピトープ、p53エピトープ、CEAエピトープ、Her2/

neue エピトープ、または Plasmodium エピトープである、請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項11】 前記ペプチドエピトープが表1～8に表されるペプチドからなる群より選択される配列を各々有する、請求項10に記載の発現ベクター。

【請求項12】 少なくとも1つの前記ペプチドエピトープが、表1～8に示されるペプチドのアナログである、請求項11に記載の発現ベクター。

【請求項13】 前記MHC標的化配列が、I i タンパク質、LAMP-I、HL S-DM、HL A-D O、H2-D O、インフルエンザマトリックスタンパク質、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルスコア抗原、Ty 粒子、I g- $\alpha$  タンパク質、I g- $\beta$  タンパク質、および I g  $\kappa$  鎖シグナル配列からなる群より選択されるポリペプチドの一領域を含む、請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項14】 前記発現ベクターが、第2のプロモーター配列をさらに含み、該プロモーター配列は1つ以上の異種HTLペプチドエピトープまたは異種CTLペプチドエピトープをコードする第3のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項15】 前記ベクターがpM i n lまたはpEP2を含む、請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項16】 前記CTLペプチドエピトープが、HLAスーパータイプについての構造モチーフを含み、それによって該CTLペプチドエピトープは、500nMより大きいアフィニティーで該スーパータイプの2つ以上のメンバーに結合する、請求項3または4に記載の発現ベクター。

【請求項17】 前記CTLペプチドエピトープが、1つより多くのHLA対立遺伝子スーパータイプについての結合アフィニティーを提供する構造モチーフを含む、請求項4または5に記載の発現ベクター。

【請求項18】 インビボで免疫応答を誘導する方法であって、該方法は、主要組織適合性(MHC)標的化配列をコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターを、哺乳動物被験体に投与する工程であって、該第1のヌクレオチド配列は2つ以上の異種ペプチドエピトープをコードする第2のヌクレオチド配列に融合され、ここで該異種ペプチドエ

ビトープは、2つのHTLペプチドエピトープまたはCTLペプチドエピトープおよびユニバーサルHTLペプチドエピトープを含む、工程を包含する、方法。

【請求項19】 前記異種ペプチドエピトープが2つ以上の異種HTLペプチドエピトープを含む、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 前記異種ペプチドエピトープがCTLペプチドエピトープおよびユニバーサルHTLペプチドエピトープを含む、請求項18に記載の方法。

【請求項21】 前記異種ペプチドエピトープがさらに1つ以上のCTLペプチドエピトープを含む、請求項19に記載の方法。

【請求項22】 前記異種ペプチドエピトープがさらに2つ以上のCTLペプチドエピトープを含む、請求項20に記載の方法。

【請求項23】 前記異種ペプチドエピトープがさらに2つ以上のHTLペプチドエピトープを含む、請求項20に記載の方法。

【請求項24】 前記HTLペプチドエピトープがユニバーサルHTLエピトープである、請求項19に記載の方法。

【請求項25】 前記ユニバーサルHTLエピトープが汎DRエピトープである、請求項20または24に記載の方法。

【請求項26】 前記汎DRエピトープが、配列AlaLysPheValAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla（配列番号38）を有する、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 前記ペプチドエピトープが、B型肝炎ウイルスエピトープ、C型肝炎ウイルスエピトープ、ヒト免疫不全ウイルスエピトープ、ヒトパピローマウイルスエピトープ、MAGEエピトープ、PSAエピトープ、PAPエピトープ、PSMエピトープ、p53エピトープ、CEAエピトープ、Her2/neuエピトープ、またはPlasmodiumエピトープである、請求項18に記載の方法。

【請求項28】 前記ペプチドエピトープが表1～8に表されるペプチドからなる群より選択される配列を各々有する、請求項27に記載の方法。

【請求項29】 少なくとも1つの前記ペプチドエピトープが、表1～8に

表されるペプチドのアナログである、請求項28に記載の方法。

【請求項30】 前記MHC標的化配列が、I iタンパク質、LAMP-I、HLS-DM、HLA-DO、H2-DO、インフルエンザマトリックスタンパク質、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルスコア抗原、Ty粒子、Ig- $\alpha$ タンパク質、Ig- $\beta$ タンパク質、およびIg $\kappa$ 鎖シグナル配列からなる群より選択されるポリペプチドの一領域を含む、請求項18に記載の方法。

【請求項31】 前記発現ベクターが、第2のプロモーター配列をさらに含み、該プロモーター配列は1つ以上の異種HTLペプチドエпитープまたは異種CTLペプチドエпитープをコードする第3のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項18に記載の方法。

【請求項32】 前記ベクターがpMin. 1またはpEP2を含む、請求項18に記載の方法。

【請求項33】 前記CTLペプチドエпитープが、HLAスーパータイプについての構造モチーフを含み、それによって該ペプチドエпитープは、500nMより大きいアフィニティーで該スーパータイプの2つ以上のメンバーに結合する、請求項20または21に記載の方法。

【請求項34】 前記CTLペプチドエпитープが、1つより多くのHLA対立遺伝子スーパータイプについての結合アフィニティーを提供する構造モチーフを含む、請求項21または22に記載の方法。

【請求項35】 インビボで免疫応答を誘導する方法であって、該方法は、主要組織適合性(MHC)標的化配列をコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターを、哺乳動物被験体に投与する工程であって、該第1のヌクレオチド配列は、異種ヒトHTLペプチドエпитープをコードする第2のヌクレオチド配列に融合されている、工程、を包含する、方法。

【請求項36】 前記第2のヌクレオチド配列がさらに2つ以上の異種HTLペプチドエпитープを含む、請求項35に記載の方法。

【請求項37】 前記第2のヌクレオチド配列がさらに1つ以上の異種CTLペプチドエпитープを含む、請求項35に記載の方法。

【請求項38】 前記HTLペプチドエピトープがユニバーサルHTLペプチドエピトープである、請求項35に記載の方法。

【請求項39】 前記ユニバーサルHTLエピトープが汎DRエピトープである、請求項38に記載の方法。

【請求項40】 前記汎DRエピトープが、配列AlaLysPheValAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla（配列番号38）を有する、請求項39に記載の方法。

【請求項41】 前記HTLペプチドエピトープおよびCTLペプチドエピトープが、B型肝炎ウイルスエピトープ、C型肝炎ウイルスエピトープ、ヒト免疫不全ウイルスエピトープ、ヒトパピローマウイルスエピトープ、MAGEエピトープ、PSAエピトープ、PAPエピトープ、PSMエピトープ、p53エピトープ、CEAエピトープ、Her2/neuエピトープ、またはPlasmodiumエピトープである、請求項37に記載の方法。

【請求項42】 前記ペプチドエピトープが表1～8に表されるペプチドからなる群より選択される配列を各々有する、請求項41に記載の方法。

【請求項43】 少なくとも1つの前記ペプチドエピトープが、表1～8に表されるペプチドのアナログである、請求項42に記載の方法。

【請求項44】 前記MHC標的化配列が、I iタンパク質、LAMP-I、HLS-DM、HLA-DO、H2-DO、インフルエンザマトリックスタンパク質、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルスコア抗原、Ty粒子、I g- $\alpha$ タンパク質、I g- $\beta$ タンパク質、およびI g $\kappa$ 鎖シグナル配列からなる群より選択されるポリペプチドの一領域を含む、請求項35に記載の方法。

【請求項45】 前記発現ベクターが、第2のプロモーター配列をさらに含み、該プロモーター配列は1つ以上の異種HTLペプチドエピトープまたは異種CTLペプチドエピトープをコードする第3のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項35に記載の方法。

【請求項46】 前記CTLペプチドエピトープが、HLAスーパータイプについての構造モチーフを含み、それによって該ペプチドエピトープは、500nMより大きいアフィニティーで該スーパータイプの2つ以上のメンバーに結合

する、請求項37に記載の方法。

【請求項47】 前記CTLペプチドエピトープが、1つより多くのHLA対立遺伝子スーパータイプについての結合アフィニティを提供する構造モチーフを含む、請求項37に記載の方法。

【請求項48】 非ヒト哺乳動物においてインビボでヒトT細胞ペプチドエピトープのヒトの免疫原性をアッセイする方法であって、該方法は、異種ヒトCTLペプチドエピトープまたは異種ヒトHTLペプチドエピトープをコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターを、該非ヒト哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項49】 前記第1のヌクレオチド配列が2つ以上の異種CTLペプチドエピトープまたは異種HTLペプチドエピトープをコードする、請求項48に記載の方法。

【請求項50】 前記非ヒト哺乳動物が、ヒトHLA対立遺伝子を発現するトランスジェニックマウスである、請求項48に記載の方法。

【請求項51】 前記ヒトHLA対立遺伝子がA11およびA2、1からなる群より選択される、請求項50に記載の方法。

【請求項52】 前記発現ベクターが、主要組織適合性(MHC)標的化配列をコードする第2のヌクレオチド配列をさらに含む、請求項48に記載の方法。

【請求項53】 前記HTLペプチドエピトープがユニバーサルHTLエピトープである、請求項48に記載の方法。

【請求項54】 前記ユニバーサルHTLエピトープが汎DRエピトープである、請求項53に記載の方法。

【請求項55】 前記汎DRエピトープが、配列AlaLysPheValAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla(配列番号38)を有する、請求項54に記載の方法。

【請求項56】 前記CTLペプチドエピトープおよびHTLペプチドエピトープが、B型肝炎ウイルスエピトープ、C型肝炎ウイルスエピトープ、ヒト免疫不全ウイルスエピトープ、ヒトパピローマウイルスエピトープ、MAGEエ

トープ、PSAエビトープ、PSMエビトープ、PAPエビトープ、p53エビトープ、CEAエビトープ、Her2/neuエビトープ、またはPlasmodiumエビトープである、請求項48に記載の方法。

【請求項57】 前記CTLペプチドエビトープまたはHTLペプチドエビトープが表1～8に表されるペプチドからなる群より選択される配列を各々有する、請求項56に記載の方法。

【請求項58】 少なくとも1つの前記ペプチドエビトープが、表1～8に表されるペプチドのアナログである、請求項57に記載の方法。

【請求項59】 前記MHC標的化配列が、I i タンパク質、LAMP-1、HLS-DM、HLA-DO、H2-DO、インフルエンザ、B型肝炎ウイルスコア抗原、Ty粒子、Ig- $\alpha$  タンパク質、Ig- $\beta$  タンパク質、およびIg $\kappa$  鎖シグナル配列からなる群より選択されるポリペプチドの一領域を含む、請求項52に記載の方法。

【請求項60】 前記発現ベクターが、第2のプロモーター配列をさらに含み、該プロモーター配列は1つ以上の異種ヒトCTLペプチドエビトープまたは異種ヒトHTLペプチドエビトープをコードする第3のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項48に記載の方法。

【請求項61】 前記ベクターがpMin.1またはpEP2を含む、請求項48に記載の方法。

【請求項62】 前記CTLペプチドエビトープが、HLA対立遺伝子スーパータイプについての結合アフィニティを提供する構造モチーフを有する、請求項48に記載の方法。

【請求項63】 前記CTLペプチドエビトープが、1つより多くのHLA対立遺伝子スーパータイプについての結合アフィニティを提供する構造モチーフを有する、請求項49に記載の方法。

【請求項64】 前記発現ベクターが、HTLペプチドエビトープおよびCTLペプチドエビトープの両方を含む、請求項48に記載の方法。



## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

(関連出願の引用)

本出願は、09/078,904(1998年5月13日出願)、および60/085,751(1998年5月15日出願)(両方が、それらの全体において本明細書中で参考として援用される)の利益を主張する。

## 【0002】

(連邦政府に援助された研究および開発の下でなされた発明に対する権利に関する記述)

本発明は、NIH助成金番号AI-42699-01、NIH助成金番号AI38584-03、およびNIH契約番号N01-AI-45241の下での政府の援助によりなされた。政府は、本発明に特定の権利を有する。

## 【0003】

(発明の分野)

本発明は、複数のCTLエピトープおよびHTLエピトープをコードする核酸ワクチンおよびMHC標的化配列に関する。

## 【0004】

(発明の背景)

ワクチンは、近代医学において基本的に重要であり、そして特定のヒト疾患と闘う際に非常に効果的であった。しかし、いくつかの衰弱性ヒト疾患を大いに制限したかまたは実質的に排除したワクチンプログラムの首尾よい実行にも関わらず、効果的なワクチンが開発されていない、世界全体で数百万人が罹患する多くの疾患が存在する。

## 【0005】

免疫学の分野における主要な進歩は、免疫応答に関与する機構のより多くの理解を導き、そして新しいワクチン接種ストラテジーの開発に洞察を提供した(Kuby, Immunology, 443~457(第3版, 1997)これは、本明細書中で参考として援用される)。これらの新しいワクチンストラテジーは、外来物質(抗原と呼ばれる)が免疫系により認識され、そして生物から排除さ

れる、機構に関して得られた知識を利用した。効果的なワクチンは、目的の抗原に対して免疫応答を誘発するワクチンである。

#### 【0006】

免疫系の分化した細胞は、疾患と闘うために必要とされる保護活性を担う。免疫応答は、2つの主要な群の細胞（リンパ球、すなわち白血球、および抗原提示細胞）を含む。これらの免疫応答細胞の目的は、外来物質（例えば、感染性生物または癌細胞）を認識し、そしてその外来物質を生物から除去することである。

#### 【0007】

2つの主要な型のリンパ球は、免疫応答の異なる局面を媒介する。B細胞は、それらの細胞表面上に特異的タンパク質（抗体と呼ばれる）を表示し、この抗体は、外来物質（抗原と呼ばれる）と特異的に結合する。エフェクターB細胞は、身体全体を循環し、そして生物から抗原を排除するように機能する、可溶性形態の抗体を産生する。免疫系のこの分枝は、液性分枝として公知である。記憶B細胞は、抗体の膜結合形態を発現し続けることによって、将来的な遭遇において抗原を認識するように機能する。

#### 【0008】

第2の主要な型のリンパ球は、T細胞である。T細胞はまた、それらの細胞表面上に特異的タンパク質を有し、この特異的タンパク質は、抗原を認識するが、B細胞では対照的に、抗原が、抗原提示細胞の表面上の特異的膜タンパク質複合体である主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）に結合されることを必要とする。2つの主要なクラスのT細胞（ヘルパーTリンパ球（「HTL」）および細胞傷害性Tリンパ球（「CTL」）と呼ばれる）は、細胞表面上での、それぞれ、CD4タンパク質またはCD8タンパク質のいずれかの存在に基づいて、しばしば区別される。免疫系のこの分枝は、細胞媒介性分枝として公知である。

#### 【0009】

第2の主要なクラスの免疫応答細胞は、抗原提示細胞において発現されるMHC分子に結合するための抗原をプロセスすることによって、抗原提示において機能する細胞である。MHC分子に結合したプロセスされた抗原は、細胞の表面に運ばれ、ここでこの抗原-MHC複合体は、T細胞に結合するために利用可能で

ある。

### 【0010】

MHC分子は、MHCクラスIおよびMHCクラスII分子に分類され得、そして2つのクラスのT細胞により認識される。ほとんど全ての細胞は、細胞傷害性Tリンパ球に抗原を提示するように機能する、MHCクラスI分子を発現する。細胞傷害性Tリンパ球は、代表的には、MHCクラスIに結合した抗原を認識する。抗原提示細胞と呼ばれる細胞のサブセットは、MHCクラスII分子を発現する。ヘルパーTリンパ球は、代表的には、MHCクラスII分子に結合した抗原を認識する。抗原提示細胞としては、樹状細胞、マクロファージ、B細胞、線維芽細胞、グリア細胞、脾 $\beta$ 細胞、胸腺上皮細胞、甲状腺上皮細胞、および血管内皮細胞が挙げられる。これらの抗原提示細胞は、一般に、MHCクラスI分子およびMHCクラスII分子の両方を発現する。また、B細胞は、抗体産生細胞および抗原提示細胞の両方として機能する。

### 【0011】

一旦、ヘルパーTリンパ球が抗原提示細胞の表面上の抗原-MHCクラスII複合体を認識すると、ヘルパーTリンパ球は、活性化し、そして免疫応答に関与する種々の細胞（B細胞および細胞傷害性Tリンパ球を含む）を活性化する増殖因子を産生する。例えば、活性化したヘルパーTリンパ球により発現される増殖因子の影響下で、抗原-MHCクラスI複合体を認識する細胞傷害性Tリンパ球は活性化する。CTLは、CTLにより特異的に認識される抗原を表示する細胞（例えば、感染した細胞または腫瘍細胞）をモニターし、そして排除する。従って、ヘルパーTリンパ球の活性化は、免疫系の液性分枝および細胞媒介性分枝の両方の活性化を刺激する。

### 【0012】

免疫応答の重要な局面（特に、この局面がワクチン効力に関する場合は）、抗原がプロセスされ、その結果、抗原が免疫系の分化した細胞により認識され得る様式である。異なる抗原プロセッシングおよび抗原提示経路が利用される。1つは、サイトゾル経路であり、この経路は、MHCクラスI分子に結合される抗原を生じる。代替的な経路は、サイトゾルをバイパスする小胞体経路である。別の経

路は、MHCクラスII分子に結合される抗原を生じるエンドサイトーシス経路である。従って、MHCクラスII分子またはMHCクラスI分子による、それぞれ、ヘルパーTリンパ球または細胞傷害性Tリンパ球への特定の抗原の細胞表面の提示は、その抗原に関するプロセッシング経路に依存する。

#### 【0013】

サイトゾル経路は、細胞内部に発現される内因性抗原をプロセスする。この抗原は、細胞のサイトゾル中の特異的プロテアーゼ複合体により分解され、そして得られた抗原ペプチドは、小胞体（細胞表面分子をプロセスするオルガネラ）中に輸送される。小胞体において、抗原ペプチドは、MHCクラスI分子に結合し、次いで免疫系の細胞傷害性Tリンパ球への提示のために細胞表面に輸送される。

#### 【0014】

細胞の外部に存在する抗原は、エンドサイトーシス経路によってプロセスされる。このような抗原は、エンドサイトーシス（これは、抗原がエンドソームと呼ばれる特定化された小胞中に、続いてリソソームと呼ばれる特定化された小胞へ運搬される）により細胞中に運ばれ、ここで抗原は、プロテアーゼによって、MHCクラスII分子に結合する抗原ペプチドに分解される。次いで、抗原ペプチド-MHCクラスII分子複合体は、免疫系のヘルパーTリンパ球への提示のために細胞表面に輸送される。

#### 【0015】

種々の因子は、効果的なワクチンの開発に考慮されなければならない。例えば、免疫系の液性分枝または細胞媒介性分枝のいずれかの活性化の程度は、特定の疾患に対するワクチンの有効性を決定し得る。さらに、記憶細胞形成を誘導することによる免疫学的な記憶の発生は、特定の疾患に対して効果的なワクチンに重要であり得る（Kuby、前出）。例えば、短いインキュベーション期間で病原体（例えば、インフルエンザウイルス）により引き起こされる感染性疾患からの保護は、液性分枝により生成された高レベルの中和抗体を必要とする。なぜなら、疾患症状は、既に、記憶細胞が活性化される前に進行しているからである。あるいは、長いインキュベーション期間で病原体（例えば、ポリオウイルス）によ

り引き起こされる感染性疾患からの保護は、感染時に中和抗体を必要としないが、代わりに標的組織に感染し得る前に病原体と闘うために、中和抗体を生成し得る記憶B細胞を必要とする。従って、特定の疾患の症状を予防または寛解するワクチンの有効性は、ワクチンにより生じる免疫応答の型に依存する。

#### 【0016】

多くの伝統的なワクチンは、免疫応答を誘発するインタクトな病原体（例えば、弱毒化ウイルスもしくは不活性化ウイルスまたは弱毒化細菌もしくは不活性化細菌）に依存した。しかし、これらの伝統的なワクチンは、長所および短所（有毒形態への弱毒化した病原体の復帰を含む）を有する。弱毒化ワクチンの復帰の問題は、病原体全体ではなく病原体の分子の使用によって取り組まれている。例えば、免疫アプローチは、組換えバクテリヤワクチンおよび合成ペプチドワクチンを組み込むように開始した（Kuby、前出）。最近、DNAワクチンもまた、使用されている（Donnellyら、Annu. Rev. Immunol. 15:617~648（1997）、これは、本明細書中に参考として援用される）。病原体分子の使用は、ワクチンの有毒形態への復帰についての可能性を回避する安全なワクチンを提供する。

#### 【0017】

ヘルパーTリンパ球を活性化する、MHCクラスII分子への抗原の標的化は、記載されており、これは、リソソーム標的化配列を使用して、抗原をリソソームに指向し、ここでこの抗原は、リソソームプロテアーゼによって、MHCクラスII分子に結合する抗原ペプチドに分解される（米国特許第5,633,234号；Thomsonら、J. Virol. 72:2246~2252（1998））。これは、生物全体ではなく病原体の個々のエピトープを投与することによって安全に提供されることを活用しつつ、複数の抗原を送達するワクチンを開発することに有利である。特に、これは、ヘルパーTリンパ球の活性化のために、MHCクラスII分子に抗原を効果的に標的化するワクチンを開発することに有利である。

#### 【0018】

いくつかの研究はまた、免疫系による感染性疾患および癌の産生および根治の

両方において、細胞傷害性T細胞の重要な役割を指摘する（Byrneら、J. Immunol. 51:682（1984）；McMichaelら、N. Engl. J. Med. 309:13（1983））。組換えタンパク質ワクチンは、CTL応答を確実に誘導せず、そしてヒトにおいて弱毒化病原体からなる別の免疫原性ワクチンの使用は、いくつかの重要な疾患の場合には、安全な関心を優先させることによって、妨げられる。HIV、HBV、HCV、およびマラリアのような疾患の場合には、変異による逸脱を阻止し、そして標的病原体の異なる単離物に対して変動するワクチンの効力を克服するために、強力なCTL応答を誘導するのみではなく、高度に保存されたエピトープに対する応答に焦点を当てることもまた、所望されるようである。

#### 【0019】

複数のエピトープに対して同時に指向される広範な応答の誘導はまた、効果的なワクチンの開発に重要であるようである。HIV感染は、おそらく、最も良好な例であり、ここで感染した宿主は、多重特異的な応答を有益とし得る。HIV感染の迅速な進行は、狭く焦点を合わせたCTL応答が誘導されるが、非プログレッサー（nonprogressor）がより広範な特異性のCTLを示しがちである場合において報告されている（Goulderら、Nat. Med. 3:212（1997）；Borrowら、Nat. Med. 3:205（1997））。高度に変異しているゲノムおよび単一のエピトープまたはわずかなエピトープのみに対して指向されるCTL応答による選択から生じる、高度に変動する性質のHIV CTLエピトープはまた、広範なエピトープCTL応答についての必要性を支持する（McMichaelら、Annu. Rev. Immunol. 15:271（1997））。

#### 【0020】

保存されたエピトープに対する多重特異的応答を誘導する、1つの可能性のアプローチは、ストリングオブビーズ（string-of-beads）様式においてエピトープをコードするミニ遺伝子プラスミドでの免疫である。ミニ遺伝子プラスミドによるマウスにおけるCTL応答、HTL応答、およびB細胞応答の誘導は、11の多さの程度のエピトープをコードする構築物を使用するいくつか

の実験室手順により記載されている (Anら、J. Virol. 71:2292 (1997); Thomsonら、J. Immunol. 157:822 (1996); Whittonら、J. Virol. 67:348 (1993); Hankeら、Vaccine 16:426 (1998); Vitielloら、Eur. J. Immunol. 27:671~678 (1997))。ミニ遺伝子は、組換えアデノウイルスまたはワクシニアでの感染によってか、または筋肉内経路または皮内経路を介する精製DNAの注射によって、インビボで送達されている (Thomsonら、J. Immunol. 160:1717 (1998); Toesら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:14660 (1997))。

#### 【0021】

ヒトでの使用のためのミニ遺伝子DNAワクチンの首尾よい開発は、エピートープMHCアフィニティー、インビボでの最大の免疫原性のための構築物の最適化、および多重エピートープミニ遺伝子構築物のインビボでの効力を試験するためのアッセイの開発を扱う特定の基本的な疑問に取り組むことを必要とする。エピートープのMHC結合アフィニティーに関して、高いアフィニティーまたは低いアフィニティーの両方のエピートープが単一のミニ遺伝子構築物内に含まれ得るか否か、およびどの範囲のペプチドアフィニティーがインビボでのCTL誘導に許容可能であるかは、現在公知ではない。これは、特に重要である。なぜなら、ドミナントエピートープは、それらのアフィニティーを変化し得るからであり、そしてなぜなら、高いMHC結合アフィニティーおよび低いMHC結合アフィニティーにより特徴付けられるドミナントエピートープおよびサブドミナントエピートープの混合物を送達し得ることが重要であり得る。

#### 【0022】

インビボでの最大の免疫原性に対するミニ遺伝子構築物の最適化に関して、所定の構築物におけるエピートープの正確な位置または隣接領域、ヘルパーT細胞のエピートープ、およびシグナル配列の存在がCTL誘導に重要であり得るか否かに関して、矛盾するデータが存在する (Del Valら、Cell 66:1145 (1991); Bergmannら、J. Virol. 68:5306 (1

994) ; Thomsonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:5845 (1995) ; Shiraiら、J. Infect. Dis. 173:24 (1996) ; Rahemtullaら、Nature 353:180 (1991) ; Jenningsら、Cell. Immunol. 133:234 (1991) ; Andersonら、J. Exp. Med. 174:489 (1991) ; Ugerら、J. Immunol. 158:685 (1997) )。最後に、ヒトワクチン候補物の試験を可能にするアッセイの開発に関して、現在までに、多重エпитープのミニ遺伝子プラスミドの全てのインビボでの免疫原性データは、マウスのクラス I MHC制限エпитープで実行されていることが留意されるべきである。これは、従来の動物モデル系において、ヒトCTLエпитープを含むミニ遺伝子のインビボ免疫原性を試験し得ることに有利である。

#### 【0023】

従って、免疫応答を刺激する、種々のHTL（ヘルパーTリンパ球）抗原およびCTL（細胞傷害性Tリンパ球）抗原を効果的に送達する方法を開発する必要性が存在する。本発明は、この必要性を満たし、そして同様に関連する利点を提供する。

#### 【0024】

（発明の要旨）

従って、本発明は、MHCクラス I 標的化配列に融合した2以上のHTLエпитープをコードする発現ベクター、およびMHCクラス I 標的化配列に融合したCTLエпитープおよびユニバーサルHTLエпитープをコードする発現ベクターを提供する。HTLエпитープは、ユニバーサルHTLエпитープであり得る（ユニバーサルMHCクラス I I エпитープとも言われる）。本発明はまた、MHCクラス I I 標的化配列に融合した2以上のHTLエпитープをコードし、かつ1以上のCTLエпитープをコードする発現ベクターを提供する。本発明はさらに、非ヒト哺乳動物において、インビボで本発明の発現ベクターを投与することによって免疫応答を刺激する方法、およびインビボでヒトT細胞ペプチドエпитープのヒト免疫原性をアッセイする方法を提供する。



## 【0025】

1つの局面において、本発明は、2以上の異種ペプチドエпитロープをコードする第2のヌクレオチド配列に融合された主要組織適合性遺伝子(MHC)標的化配列をコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクター(ここでこの異種ペプチドエпитロープは、2つのHTLペプチドエпитロープまたはCTLペプチドエпитロープおよびユニバーサルHTLペプチドエпитロープを含む)を提供する。

## 【0026】

別の局面において、本発明は、インビボで免疫応答を誘導する方法を提供し、この方法は、哺乳動物の被検体に、2以上の異種ペプチドエпитロープをコードする第2のヌクレオチド配列に融合された主要組織適合性遺伝子(MHC)標的化配列をコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターを投与する工程を包含し、ここでこの異種ペプチドエпитロープが2つのHTLペプチドエпитロープまたはCTLペプチドエпитロープおよびユニバーサルHTLペプチドエпитロープを含む、工程を包含する。

## 【0027】

別の局面において、本発明は、インビボで免疫応答を誘導する方法を提供し、この方法は、哺乳動物の被検体に、異種ヒトHTLペプチドエпитロープをコードする第2のヌクレオチド配列に融合された主要組織適合性遺伝子(MHC)標的化配列をコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターを投与する工程を包含する。

## 【0028】

別の局面において、本発明は、非ヒト哺乳動物において、インビボでヒト細胞ペプチドエпитロープのヒト免疫原性をアッセイする方法を提供し、この方法は、非ヒト哺乳動物に、異種ヒトCTLペプチドエпитロープまたは異種ヒトHTLペプチドエпитロープをコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターを投与する工程を包含する。

## 【0029】

1つの実施態様において、異種ペプチドエпитロープは2以上の異種HTLペ

チドエプトループを含む。別の実施態様において、異種ペプチドエプトループは、CTLペプチドエプトループおよびユニバーサルHTLペプチドエプトループを含む。別の実施態様において、異種ペプチドエプトループはさらに、2以上の異種CTLペプチドエプトループを含む。別の実施態様において、発現ベクターは、HTLペプチドエプトループおよびCTLペプチドエプトループの両方を含む。

#### 【0030】

1つの実施態様において、1つのHTLペプチドエプトループは、ユニバーサルHTLエプトループである。別の実施態様において、ユニバーサルHTLエプトループは、汎DRエプトループである。別の実施態様において、汎DRエプトループは、配列AlaLysPheValAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla（配列番号38）を有する。

#### 【0031】

1つの実施態様において、ペプチドエプトループは、B型肝炎ウイルスエプトループ、C型肝炎ウイルスエプトループ、ヒト免疫不全ウイルスエプトループ、ヒトパピローマウイルスエプトループ、MAGEエプトループ、PSAエプトループ、PSMエプトループ、PAPエプトループ、p53エプトループ、CEAエプトループ、Her2/neuエプトループ、またはPlasmodiumエプトループである。別の実施態様において、ペプチドエプトループは、それぞれ、表1～8に示されるペプチドからなる群より選択される配列を有する。別の実施態様において、少なくとも1つのペプチドエプトループは、表1～8に示されるペプチドのアナログである。

#### 【0032】

1つの実施態様において、MHC標的化配列は、I iタンパク質、LAMP-I、HLS-DM、HLA-DO、H2-DO、インフルエンザマトリクスタンパク質、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルスcore抗原、Ty粒子、Ig-αタンパク質、Ig-βタンパク質、およびIgκ鎖シグナル配列からなる群より選択されるポリヌクレオチドの領域を含む。

#### 【0033】

1つの実施態様において、発現ベクターはさらに、1以上の異種HTLペプチドエプトループまたは異種CTLペプチドエプトループをコードする第3のヌクレオ

チド配列に作動可能に連結された第2のプロモーター配列を含む。別の実施態様において、CTLペプチドエピトープは、HLAスーパータイプ (super type) についての構造モチーフを含み、それによってペプチドCTLエピトープは、500 nMよりも大きいアフィニティを有するスーパータイプの2以上のメンバーに結合する。別の実施態様において、CTLペプチドエピトープは、1よりも多いHLA対立遺伝子スーパータイプに対する結合アフィニティを提供する構造モチーフを有する。

#### 【0034】

1つの実施態様において、非ヒト哺乳動物は、ヒトHLA対立遺伝子を発現するトランスジェニックマウスである。別の実施態様において、ヒトHLA対立遺伝子は、A11およびA2.1からなる群より選択される。別の実施態様において、非ヒト哺乳動物は、ヒトHLA対立遺伝子を発現するマカクである。

#### 【0035】

(定義)

「HTL」ペプチドエピトープまたは「MHC IIエピトープ」は、MHCクラスII制限エピトープ、すなわち、MHCクラスII分子により結合されるエピトープである。

#### 【0036】

「CTL」ペプチドエピトープまたは「MHC Iエピトープ」は、MHCクラスI制限エピトープ、すなわち、MHCクラスI分子により結合されるエピトープである。

#### 【0037】

「MHC標的化配列」とは、細胞質経路（例えば、MHCクラスI抗原プロセシング経路）、小胞体経路、または囊胞内膜経路（例えば、MHCクラスII抗原プロセシング経路）に、例えば、ペプチドエピトープを含むポリペプチドを標的化するペプチド配列をいう。

#### 【0038】

用語「異種」は、核酸の部分参照して使用される場合、核酸が、本質的に、互いに同じ関係では見出されない2つ以上のサブ配列を含むことを示す。例えば

、新規な機能的核酸を作製するために配置された、非関連遺伝子由来の2つ以上の配列（例えば、ある起源由来のプロモーターおよび別の起源由来のコード領域）を有する核酸が、代表的には、組換え産生される。同様に、異種タンパク質は、タンパク質が、天然には互いに同じ関係では見出されない2つ以上のサブ配列を含むことを示す（例えば、異なるポリペプチド由来のサブ配列、隣接部分に天然には存在しない同じポリペプチド由来のペプチドエピトープ、または単一ペプチドエピトープの反復を含む融合ポリペプチド）。

### 【0039】

本明細書中で使用される用語「ユニバーサルMHCクラスIIエピトープ」または「ユニバーサルHTLエピトープ」は、複数のMHCクラスII対立遺伝子の遺伝子産物に結合するMHCクラスIIペプチドエピトープをいう。例えば、DR、DP、およびDQ対立遺伝子はヒトMHC II対立遺伝子である。一般に、特有のペプチドセットは、1つのMHCクラスII対立遺伝子の特定の遺伝子産物に結合する。対して、ユニバーサルMHCクラスIIエピトープは、複数のMHCクラスII対立遺伝子の遺伝子産物に結合し得る。ユニバーサルMHCクラスIIエピトープは、2つ以上のMHCクラスII対立遺伝子、一般に3つ以上のMHCクラスII対立遺伝子、そして特に5つ以上のMHCクラスII対立遺伝子に結合する。従って、発現ベクター中のユニバーサルMHCクラスIIエピトープの存在は、それが、ペプチドに結合し得る対立遺伝子MHCクラスII分子の数、および結果として、活性化されるヘルパーTリンパ球の数を増加させるように機能するので、有利である。

### 【0040】

ユニバーサルMHCクラスIIエピトープは、当該分野で周知であり、そして例えば、「汎DRエピトープ」（「PADRE」とも称する）（Alexanderら、Immunity 1:751-761（1994）；WO95/07707、USSN60/036,713、USSN60/037,432、PCT/US98/01373、09/009,953およびUSSN60/087,192（各々は、本明細書中に参考として援用される））のようなエピトープを包含する。本発明の「汎DR結合エピトープ」または「PADRE」ペプチド

は、少なくとも7つの異なるDR分子、好ましくは12の最も共通するDR分子のうち7つ、最も好ましくは12の最も共通するDR分子(DR1、2w2b、2w2a、3、4w4、4w14、5、7、52a、52b、52c、および53)のうち9つ、または代替的には、ヒト集団の75%以上、好ましくはヒト集団の80%以上を表すDR分子のパネルの50%に結合し得るペプチドである。汎DRエピトープは、多数のDR対立遺伝子に結合し得、そしてT細胞に強く免疫原性である。例えば、汎DRエピトープは、天然MHCクラスIIエピトープよりも、免疫応答の誘発時により有効であることが見出された(Alexander、前出)。PADREエピトープの例は、ペプチドAlaLysPheValAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla(配列番号38)(PADREエピトープのさらなる例については、TTC事件番号018623-006221(1999年5月12日出願、USSN\_\_\_\_、その全体が本明細書中に参考として援用される)の表8を参照のこと)である。

#### 【0041】

特定のアミノ酸配列に関して、「エピトープ」は、特定の免疫グロブリンによる認識に関与するアミノ酸残基のセット、またはT細胞の状況においては、T細胞レセプタータンパク質および/または主要組織適合性複合体(MHC)レセプターによる認識に必要な残基のセットである。免疫系設定において、インビボまたはインビトロで、エピトープは、免疫グロブリン、T細胞レセプター、またはHLA分子により認識される部位を共に形成する分子(例えば、一次、二次、および三次のペプチド構造、および電荷)の集団の特徴である。本開示を通して、エピトープおよびペプチドは、しばしば相互に使用される。しかし、本発明のエピトープよりも大きく、かつこれを含む単離または精製されたタンパク質分子またはペプチド分子もなお、本発明の範囲内に含まれることが理解される。

#### 【0042】

HLAクラスI分子に関して、本明細書中で使用される「高親和性」は、50 nM未満のIC50(またはK<sub>d</sub>)での結合として規定される。「中程度の親和性」は、約50~約500 nMの間のIC50(またはK<sub>d</sub>)での結合である。HLAクラスII分子への結合に関して「高親和性」は、100 nM未満のK<sub>d</sub>

での結合として規定される。「中程度の親和性」は、約100～約1000 nMの間の $K_D$ での結合である。結合を決定するためのアッセイは、例えば、PCT公報WO94/20127およびWO94/03205において、詳細に記載される。あるいは、結合は、参照ペプチドに対して発現される。特定のアッセイがより感受性になるか、またはより感受性でなくなるにつれて、試験したペプチドのIC50はいくらか変化し得る。しかし、参照ペプチドに対する結合は、有意に変化しない。例えば、参照ペプチドのIC50は10倍増加するような条件下で実行したアッセイにおいて、試験ペプチドのIC50値はまた、約10倍シフトする。従って、曖昧さを避けるために、ペプチドが良好なバインダーであるか、中程度のバインダーであるか、弱いバインダーであるか、または負のバインダーであるかの評価は、一般に、標準ペプチドのIC50に対するそのIC50に基づく。

#### 【0043】

本開示を通じて、結果は、「IC50」によって表現される。IC50は、参照ペプチドの結合の50%の阻害が観察される、結合アッセイ中のペプチドの濃度である。アッセイが実行される条件を与えると（すなわち、HLAタンパク質の限定および標識化ペプチド濃度）、これらの値は、 $K_D$ 値に近づく。IC50値は、しばしば劇的に（アッセイ条件が変動する場合）、そして使用される特定の試薬（例えば、HLA調製など）に依存して変更し得ることに注意すべきである。例えば、過剰な濃度のHLA分子は、所定のリガンドの見かけ上測定されたIC50を増大させる。

#### 【0044】

用語「同一」または「同一性」%とは、2つ以上のペプチド配列の背景において、比較し、そしてデフォルトプログラムパラメーターを用いる配列比較アルゴリズムを用いて、またはマニュアルアラインメントおよび目視検査によって測定されるように、比較ウィンドウにわたって一致が最大になるように整列した場合、同じであるか、または同じであるアミノ酸残基の特定化された割合を有する2つ以上の配列またはサブ配列をいう。

#### 【0045】

句「単離された」または「生物学的に純粋な」とは、その天然状態で見られるように通常その物質に伴う成分を実質的または本質的に含まない物質をいう。従って、本発明により単離されたペプチドは、好ましくは、インサイチュ環境でペプチドと通常関連する物質を含まない。

#### 【0046】

「主要組織適合性複合体」または「MHC」は、生理的免疫応答を担う細胞性相互作用の制御下で役割を果たす遺伝子のクラスターである。ヒトにおいて、MHC複合体はまた、HLA複合体として公知である。MHCおよびHLA複合体の詳細な説明については、Paul, Fundamental Immunology (第3版、1993)を参照のこと。

#### 【0047】

「ヒト白血球抗原」または「HLA」は、ヒトクラスIまたはクラスII主要組織適合性複合体(MHC)タンパク質である(例えば、Stitesら、Immunology (第8版、1994)を参照のこと)。

#### 【0048】

本明細書中で使用される「HLAスーパータイプまたはファミリー」とは、共有されるペプチド結合特異性に基づいてグループ分けされるHLA分子のセットを記載する。特定のアミノ酸モチーフを有するペプチドについて幾分類似の結合親和性を共有するHLAクラスI分子が、HLAスーパータイプにグループ分けされる。用語HLAスーパーファミリー、HLAスーパータイプファミリー、HLAファミリー、およびHLA<sub>xx</sub>様スーパータイプ分子(xxは、特定のHLAタイプを示す)は、同義語である。

#### 【0049】

用語「モチーフ」は、特定のHLA分子によって認識される所定の長さのペプチド、通常、クラスI HLAモチーフについて約8～約13アミノ酸、およびクラスII HLAモチーフについて約6～約25アミノ酸のペプチドにおける残基のパターンをいう。ペプチドモチーフは、代表的には、各ヒトHLA対立遺伝子によってコードされる各タンパク質とは異なり、そして第一および第二のアナログ残基のパターンにおいて異なる。

## 【0050】

「スーパーモチーフ」は、2つ以上のHLA対立遺伝子によってコードされるHLA分子によって共有されるペプチド結合特異性である。従って、好ましくは、2つ以上のHLA抗原による高いまたは中程度の親和性（本明細書中で定義される）を有して認識される。

## 【0051】

「交差結合」は、ペプチドが1つより多いHLA分子により結合されることを示す；同義語は縮重結合である。

## 【0052】

用語「ペプチド」は、代表的には、隣接したアミノ酸の $\alpha$ アミノ基とカルボキシル基との間のペプチド結合により一方を他方に連結した一連の残基（代表的には、L-アミノ酸）を示すために、本明細書において「オリゴペプチド」と相互交換して使用される。本発明の好ましいCTL誘導オリゴペプチドは、長さが13残基またはそれより短く、そして通常、約8～約11残基の間、好ましくは9または10の残基からなる。好ましいHTL誘導オリゴペプチドは、長さが約50残基未満であり、そして通常、約6～約30残基の間、より通常には約12～25、そしてしばしば、約15～20の間の残基からなる。

## 【0053】

「免疫原性ペプチド」または「ペプチドエпитープ」は、そのペプチドがHLA分子に結合し、そしてCTLおよび／またはHTL応答を誘導するような対立遺伝子特異的モチーフまたはスーパーモチーフを含むペプチドをいう。従って、本発明の免疫原性ペプチドは、適切なHLA分子に結合し得、その後、免疫原性ペプチドが由来する抗原に対する細胞傷害性T細胞応答、またはヘルパーT細胞応答を誘導し得る。

## 【0054】

「防御免疫応答」は、感染因子に由来する抗原または腫瘍抗原に対するCTLおよび／またはHTL応答をいい、これは、疾患症状または進行を予防するか、または少なくとも部分的に阻止する。免疫応答はまた、ヘルパーT細胞の刺激により促進されている抗体応答を含み得る。



## 【0055】

用語「残基」は、アミド結合またはアミド結合模倣物によりオリゴペプチドに取り込まれ得るアミノ酸またはアミノ酸模倣物をいう。

## 【0056】

「合成ペプチド」は、天然に存在しないが、化学合成または組換えDNA技術のような方法により合成されるペプチドをいう。

## 【0057】

ペプチド化合物を記載するために使用される術語は、アミノ基が各アミノ酸残基の左側（N末端）に示され、そしてカルボキシル基が右側（C末端）に示される従来の規則に従う。アミノ酸残基の位置が、ペプチドエピトープ中で言及される場合、それらはアミノからカルボキシルへの方に番号付けられ、1位は、エピトープ、またはそれが一部分であり得るペプチドもしくはタンパク質のアミノ末端に最も近い位置である。本発明の選択された特定の実施態様を表す式において、アミノ末端基およびカルボキシル末端基は、特に示されていないが、他に示されなければ、それらが生理的pH値でとる形態である。アミノ酸構造式において、各残基は、一般に、標準的な三文字表記または一文字表記によって示される。アミノ酸残基のL型は、大文字の一文字表記であるか、または最初の文字が大文字である三文字記号で表され、そしてD型を有するアミノ酸のD型は、小文字の一文字表記または小文字の三文字表記により表される。グリシンは、不斉炭素原子を有さず、単に「Gly」またはGといわれる。

## 【0058】

本明細書中で使用される用語「発現ベクター」は、適切な標的細胞において目的の抗原（例えば、MHCクラスIまたはクラスIIエピトープ）を発現し得る核酸分子をいうことが意図される。発現ベクターは、例えば、プラスミドまたはウイルス（例えば、DNAもしくはRNAウイルス）であり得る。発現ベクターは、所望の免疫応答を刺激するために、適切な細胞もしくは組織において目的の抗原を発現するようなプロモーターエレメントを含む。

## 【0059】

（発明の詳細な説明）

細胞傷害性Tリンパ球（CTL）およびヘルパーTリンパ球（HTL）は、感染病原性（例えば、ウイルス、細菌、および原生動物）；腫瘍細胞；自己免疫疾患などに対する免疫のために重要である。本発明は、CTLおよび／またはHTL応答を誘導するペプチドエピトープをコードするミニ遺伝子を提供する。本発明のミニ遺伝子はまた、MHC標的化配列を含み得る。異なるエピトープをコードする種々のミニ遺伝子は、HLAトランスジェニックマウスを用いる免疫原性について試験され得る。エピトープは、代表的には、少なくとも2つ以上のHTLエピトープの組み合わせ、またはCTLエピトープ+ユニバーサルHTLエピトープであり、そして必要に応じてさらなるHTLおよび／またはCTLエピトープを含む。2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、または約50の異なるエピトープ（HTLおよび／またはCTLのいずれか）は、MHC標的化配列と共に、ミニ遺伝子に含まれ得る。エピトープは、異なるHLA制限を有し得る。試験されるべきエピトープは、ウイルス（例えば、HIV、HBV、HCV、HSV、CMV、HPV、およびHTLV）；癌抗原（例えば、p53、Her2/Neu、MAGE、PSA、ヒト乳頭腫ウイルス、およびCEA）；寄生物（例えば、Trypanosoma、Plasmodium、Leishmania、Giardia、Entamoeba）；自己免疫疾患（例えば、慢性関節リウマチ、重症筋無力症、および紅斑性狼瘡）；真菌（例えば、AspergillusおよびCandida）；細菌（例えば、Escherichia coli、Staphylococci、Chlamydia、Mycobacteria、Streptococci、およびPseudomonas）に由来するエピトープが挙げられる。ミニ遺伝子によりコードされるエピトープは、公開PCT出願WO93/07421、WO94/02353、WO95/010000、WO97/04451、およびWO97/05348（本明細書中に参考として援用される）に記載の方法を用いて選択されそして試験される。

#### 【0060】

（HTLエピトープおよびCTLエピトープ）

本発明の発現ベクターは、1つ以上のMHCクラスIIおよび／またはクラス

I エピトープおよびMHC標的化配列をコードする。発現ベクター中に存在する複数のMHCクラスIIまたはクラスI エピトープは、同じ抗原に由来し得るか、またはMHC エピトープは、異なる抗原に由来し得る。例えば、発現ベクターは、同じウイルスの2つの異なる抗原または異なるウイルスの2つの異なる抗原に由来し得る1つ以上のMHC エピトープを含み得る。さらに、任意のMHC エピトープは、本発明の発現ベクターにおいて使用され得る。例えば、表1～8に示される任意の単一のMHC エピトープまたはMHC エピトープの組み合わせが、本発明の発現ベクターにおいて使用され得る。他のペプチドエピトープは、例えば、HLA対立遺伝子特異的モチーフまたはスーパーモチーフを含むエピトープを選択するためにコンピュータを使用することにより、当業者に選択され得る。本発明の発現ベクターはまた、1つ以上のユニバーサルMHCクラスII エピトープ（例えば、PADRE（例えば、TTC事件番号018623-006221（1999年5月12日出願、USSN\_\_\_\_\_）の配列番号28および表8を参照のこと）をコードし得る。

#### 【0061】

ユニバーサルMHCクラスII エピトープは、他のMHCクラスI およびクラスII エピトープと有利に組み合わせられて、所定の抗原に応答して活性化される細胞の数を増大させ、そしてMHC反応性対立遺伝子のより広範な集団範囲を提供し得る。従って、本発明の発現ベクターは、抗原に対して特異的なMHC エピトープ、ユニバーサルMHCクラスII エピトープ、または特異的なMHC エピトープと少なくとも1つのユニバーサルMHCクラスII エピトープとの組み合わせをコードし得る。

#### 【0062】

MHCクラスI エピトープは、一般に、約5～15アミノ酸長であり、特に約8～11アミノ酸長である。MHCクラスII エピトープは、一般に、約10～25アミノ酸長であり、特に約13～21アミノ酸長である。MHCクラスI またはII エピトープは、目的の任意の所望の抗原に由来し得る。目的の抗原は、ウイルス抗原、表面レセプター、腫瘍抗原、癌遺伝子、酵素、または免疫応答が所望される任意の病原、細胞もしくは分子であり得る。エピトープは、1つまた

は複数のHLA対立遺伝子に結合する能力に基づいて選択され得、そして以下に記載の「アナログ」技術を用いて選択され得る。

### 【0063】

(標的化配列)

本発明の発現ベクターは、MHC標的化配列に作動可能に連結された1つ以上のMHCエピトープをコードする。MHC標的化配列の使用は、ペプチドエピトープをMHC分子アセンブリおよび細胞表面への輸送の部位に指向させることにより、抗原単独の送達に対して、抗原に対する免疫応答を増強し、それにより、T細胞への結合およびその活性化に利用可能なMHC分子-ペプチドエピトープ複合体の数の増大を提供する。

### 【0064】

MHCクラスI標的化配列は、本発明において使用される。例えば、MHCクラスIエピトープペプチドは、細胞質経路または小胞体に標的化する配列である(例えば、Rammenseeら、Immunogenetics 41:178-228 (1995)を参照のこと)。例えば、細胞質経路は、細胞内で発現される内因性抗原をプロセッシングする。特定の理論に縛られることを望まないが、細胞質タンパク質は、プロテアソームのエンドペプチダーゼ活性により少なくとも部分的に分解され、次いでTAP分子(プロセッシングと関連した輸送体)により小胞体に輸送されと考えられる。小胞体において、抗原は、MHCクラスI分子に結合する。小胞体シグナル配列は、細胞質プロセッシング経路を迂回し、そして小胞体に直接的に内因性抗原を標的化する。ここでペプチドフラグメントへのタンパク質溶解性分解が生じる。このようなMHCクラスI標的化配列は当該分野で周知であり、例えば、シグナル配列(例えば、Igκ、組織プラスミノーゲン活性化因子、またはインスリン)を含む。好ましいシグナルペプチドは、ヒトIgκ鎖配列である。小胞体シグナル配列はまたMHCクラスIIエピトープを小胞体(MHCクラスI分子アセンブリの部位)に標的化するために使用され得る。

### 【0065】

MHCクラスII標的化配列もまた、本発明において使用され得る。例えば、

ペプチドをエンドサイトーシス経路に標的化するペプチドが挙げられる。これらの標的化配列は、代表的には、エンドサイトーシス経路に侵入するように細胞外抗原を指向し、これによって、抗原がリソソーム区画に移され、ここで、この抗原は、MHCクラスII分子への結合のために抗原ペプチドにタンパク質分解的に切断される。細胞外抗原の通常のプロセッシングと同様に、MHCクラスIIエピトープをエンドサイトーシス経路のエンドソームそして／または続いてリソソーム（ここで、MHCクラスIIエピトープはMHCクラスII分子に結合させ得る）へ指向させる配列は、MHCクラスII標的化配列である。例えば、本発明に有用なMHCクラスII標的化配列のグループは、リソソーム標的化配列である。これは、ポリペプチドをリソソームに局在化させる。MHCクラスII分子は、代表的には、リソソーム中のエンドサイトーシス抗原のタンパク質分解プロセッシングに由来する抗原ペプチドに結合するので、リソソーム標的化配列は、MHCクラスII標的化配列として機能し得る。リソソーム標的化配列は、当該分野で周知であり、そして、Augustら（米国特許第5,633,234号、1997年5月27日公開、本明細書中に参考として援用される）により記載されるようなリソソームタンパク質LAMP-1およびLAMP-2において見出される配列を含む。

#### 【0066】

リソソーム標的化配列を含む他のリソソームタンパク質としては、HLA-DMが挙げられる。HLA-DMは、抗原ペプチドのMHCクラスII分子への結合を容易にする際に機能するエンドソーム／リソソームタンパク質である。それはリソソーム中に局在するので、HLA-DMは、MHCクラスII分子標的化配列として機能し得るリソソーム標的化配列を有する（Copierら、J. Immunol. 157:1017-1027（1996）、これは、本明細書中に参考として援用される）。

#### 【0067】

常在性リソソームタンパク質HLA-DOもまた、リソソーム標的化配列として機能し得る。上記の常在性リソソームタンパク質LAMP-1およびHLA-DM（これらは、タンパク質をリソソームに標的化する特異的なTyr含有モチ

ーフをコードする)と対照的に、HLA-DQは、HLA-DMとの会合によりリソソームに対して標的化される(Liljedahlら、EMBO J, 15:4817-4824 (1996)、これは、本明細書中に参考として援用される)。従って、HLA-DMとの会合、および結果として、HLA-DQのリソソームへの転移を引き起こすHLA-DQの配列は、MHCクラスII標的化配列として使用され得る。同様に、HLA-DQのマウスホモログ、H2-DQは、MHCクラスII標的化配列を誘導するために使用され得る。MHCクラスIIエピトープは、HLA-DQまたはH2-DQに融合され得、そしてリソソームへ標的化され得る。

#### 【0068】

別の例では、B細胞レセプターサブユニットIg- $\alpha$ およびIg- $\beta$ の細胞質ドメインが、抗原インターナリゼーションを媒介し、そして抗原提示の効率を増大させる(Bonnerotら、Immunity 3:335-347 (1995)、これは、本明細書中に参考として援用される)。従って、Ig- $\alpha$ タンパク質およびIg- $\beta$ タンパク質の細胞質ドメインは、MHCクラスII分子のプロセッシングおよびそれへの結合のためのエンドサイトーシス経路へMHCクラスIIエピトープを標的化するMHCクラスII標的化配列として機能し得る。

#### 【0069】

MHCクラスIIエピトープをエンドサイトーシス経路に指向させるMHCクラスII標的化配列の別の例は、ポリペプチドを分泌されるように指向させる配列である。ここで、そのポリペプチドはエンドソーム経路に侵入し得る。ポリペプチドを分泌されるように指向させるこれらのMHCクラスII標的化配列は、通常の経路を模倣する。この経路では、外因性の細胞外抗原が、MHCクラスII分子に結合するペプチドにプロセッシングされる。小胞体を通り、そして最終的に分泌されるようにポリペプチドを指向させるように機能する任意のシグナル配列は、分泌されたポリペプチドが、エンドソーム/リソソーム経路に侵入し得、そしてMHCクラスII分子に結合し得るペプチドに切断され得る限り、MHCクラスII標的化配列として機能し得る。このような融合の例は、図11に示される。ここでは、 $\kappa$ 免疫グロブリンのシグナル配列は、複数のMHCクラスII

エピトープに融合される。

#### 【0070】

別の例では、I i タンパク質は、小胞体においてMHCクラスII分子に結合する。ここで、それは、小胞体に存在するペプチドがMHCクラスII分子に結合するのを防ぐように機能する。従って、MHCクラスIIエピトープのI i タンパク質への融合は、MHCクラスIIエピトープを小胞体およびMHCクラスII分子に標的化する。例えば、I i タンパク質のCLIP配列は、除去されて、そしてMHCクラスIIエピトープが小胞体に指向されるように、MHCクラスIIエピトープ配列で置換され得る。ここでこのエピトープは、MHCクラスII分子に結合する。

#### 【0071】

いくつかの場合では、抗原自体が、MHCクラスIIもしくはIの標的化配列として作用し得、そしてユニバーサルMHCクラスIIエピトープに融合されて、免疫応答を刺激し得る。細胞質ウイルス抗原は、一般にプロセッシングされ、そしてMHCクラスI分子との複合体として提示されるが、長期生存細胞質タンパク質（例えば、インフルエンザマトリックスタンパク質）は、MHCクラスII分子プロセッシング経路に侵入し得る（GueguenおよびLong、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14692-14697（1996）、これは本明細書中に参考として援用される）。従って、長期生存細胞質タンパク質は、MHCクラスII標的化配列として機能し得る。例えば、ユニバーサルMHCクラスIIエピトープに融合されたインフルエンザマトリックスタンパク質をコードする発現ベクターは、インフルエンザに対する免疫応答を刺激するためにインフルエンザ抗原およびユニバーサルMHCクラスIIエピトープをMHCクラスII経路に標的化するために有利に使用され得る。

#### 【0072】

MHCクラスII標的化配列として機能する抗原の他の例としては、自発的に粒子を形成するポリペプチドが挙げられる。このポリペプチドは、それらを生産する細胞から分泌され、そして自発的に粒子を形成し、これは、エンドサイトーシス（例えば、レセプター媒介エンドサイトーシス）により抗原提示細胞に取り

込まれるか、または食作用により飲み込まれる。この粒子は、エンドソーム／リソソーム経路に侵入した後抗原ペプチドにタンパク質分解的に切断される。

### 【0073】

自発的に粒子を形成する1つのこのようなポリペプチドは、HBV表面抗原(HBV-S)である(Diminskyら、Vaccine 15:637-647 (1997); Le Borgneら、Virology 240:304-315 (1998)、その各々は本明細書中に参考として援用される)。粒子を自発的に形成する別のポリペプチドは、HBVコア抗原である(Kuhroberら、International Immunol. 9:1203-1212 (1997)、これは、本明細書中に参考として援用される)。粒子を自発的に形成するなお別のポリペプチドは、酵母Tyタンパク質である(Weberら、Vaccine 13:831-834 (1995)、これは、本明細書中に援用される)。例えば、ユニバーサルMHCクラスIIエпитープに融合されるHBV-S抗原を含む発現ベクターは、HBVに対する免疫応答を刺激するためのMHCクラスII経路にHBV-S抗原およびユニバーサルMHCクラスIIエпитープを標的化するために有利に使用され得る。

### 【0074】

(HLA分子についてのペプチドエпитープの結合親和性)

HLA多型性のかなりの程度が、ワクチン開発へのエпитープを基礎としたアプローチを考慮に入れられる重要な因子である。この因子を特定するために、複数のHLA分子に高親和性または中度親和性で結合し得るペプチドの同定を包含するエпитープの選択が好ましくは利用される。最も好ましくは、これらのエпитープは、2つ以上の対立遺伝子特異的HLA分子に高親和性または中度親和性で結合する。

### 【0075】

ワクチン組成物のための目的のCTL-誘導ペプチドは、好ましくは500 nM未満のクラスI HLA分子に結合親和性を有するペプチドを含む。HTL-誘導ペプチドは、好ましくは1000 nM未満のクラスII HLA分子への結合親和性を有するペプチドを含む。例えば、ペプチド結合は、インビトロにおい



て、精製されたHLA分子に結合する候補ペプチドの能力を試験することにより評価される。次いで、高親和性または中度親和性を示すペプチドは、さらなる分析を考慮される。選択されたペプチドは、スーパータイプファミリーの他のメンバーで試験される。好ましい実施態様において、次いで、交差反応性結合を示すペプチドは、ワクチンまたは細胞性スクリーニング分析に用いられる。

#### 【0076】

HLA結合親和性が高いほど、代表的には、より高い免疫原性に関連する。より大きい免疫原性は、いくつかの異なる手段において明白にされ得る。免疫原性は、免疫応答が完全に惹起されるか否かに、および任意の特定の応答の活力に、ならびに応答が惹起される集団の程度に対応する。例えば、ペプチドは集団の多様なアレイにおいて、活発な応答を生じる例ではないが、免疫応答を惹起し得る。これらの原理に従って、高結合ペプチドの90%近くが、中度の親和性で結合するペプチドの約50%と対照的に、免疫原性であることが見出されている。さらに、結合親和性が高いペプチドほど、より活発な免疫原性応答を導く。結果として、高い結合親和性のペプチドが用いられれば、類似の生物学的効果を誘導するために必要なペプチドはより少なくなる。従って、本発明の好ましい実施態様において、高い結合エピトープが特に有用である。

#### 【0077】

HLAクラスI分子についての結合親和性と結合抗原上の別個のペプチドエピトープの免疫原性との間の関連性は、本発明者らにより当該分野で初めて決定された。結合親和性と免疫原性との間の相関は、2つの異なる実験アプローチにおいて分析された(Setterら、J. Immunol. 153:5586~5592(1994))。最初のアプローチにおいて、HLA結合親和性における10,000倍の範囲にわたる可能性のあるエピトープの免疫原性が、HLA-A\*0201トランスジェニックマウスにおいて分析された。第2のアプローチにおいて、約100の異なるB型肝炎ウイルス(HBV)由来の可能性のあるエピトープ(すべてがA\*0201結合モチーフを保有する)の抗原性が、急性肝炎患者由来のPBL(末梢血リンパ球)を用いて評価された。これらのアプローチに従い、約500nM(好ましくは50nM以下)の親和性閾値がCTL応答を

惹起するペプチドエпитオプの能力を決定することが確認された。これらのデータは、天然に処理されたペプチドおよび合成されたT細胞エイトープについてのクラスI結合親和性測定について真実である。これらのデータはまたT細胞応答の状態における決定基選択の重要な役割を示す（例えば、Schaefferら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:4649~4653、1989を参照のこと）。

#### 【0078】

HLAクラスII DR分子の場合における免疫原性と関連した親和性閾値がまた、記載されている（例えば、Southwoodら、J. Immunology 160:3363~3373（1998）、およびUSSN60/087192、1998年5月29日出願、を参照のこと）。DR結合親和性の生物学的に有意な閾値を規定するため、それらの制限エレメント（すなわち、モチーフに結合するHLA分子）のための32DR制限エイトープの結合親和性のデータベースが編集された。約半分の場合（32エイトープの15エイトープ）、DR制限は、高い結合親和性に関連した（すなわち、100nM未満の結合親和性）。他の約半分の場合（32の16）、DR制限は中度の親和性（100~1000nMの範囲の結合親和性）に関連した。32のうち1つのみの場合は、DR制限は1000nM以上のIC50と関連した。従ってDR分子の場合、1000nMが、免疫原性と関連する親和性閾値として規定され得る。

#### 【0079】

（ペプチドエイトープ結合モチーフおよびスーパーモチーフ）

過去数年間、HLAクラスIおよびクラスII分子の大部分が相対的に少ないスーパータイプ（それぞれ、大きく重複するペプチド結合レパートリーおよび主なペプチド結合ポケットのコンセンサス構造により特徴付けられる）に分類され得ることを実証する証拠が蓄積されてきた。

#### 【0080】

HLA分子ポケット分析のため、結晶学的な研究において記載されるようにHLAクラスI分子のBポケットおよびFポケットを含む残基が分析された（Guoら、Nature 360:364（1992）；Saperら、J. Mol

. Biol. 219:277 (1991); Maddenら, Cell 75:693 (1993); Parhamら, Immunol. Rev. 143:141 (1995)。これらの分析において、残基9、45、63、66、67、70および99は、Bポケットを作成すると考えられた；そしてBポケットはペプチドリガンドの第2の部位におけるアミノ酸残基について特異性を決定すると思われた。同様に、残基77、80、81および116は、Fポケットの特異性を決定すると考えられた；このFポケットは、HLAクラスI分子によるペプチドリガンド結合のC末端残基について特異性を決定すると考えられた。

### 【0081】

単一アミノ酸置換された抗原アナログの研究、および内在性に結合した、天然に処理されたペプチドの配列決定を通じて、HLA分子への対立遺伝子特異的結合に必要な、重要な残基が同定された。これらの残基の存在は、HLA分子についての結合親和性と関連する。高親和性結合および中度親和性結合と関連するモチーフおよび／またはスーパーモチーフの同定は、ワクチンへの封入のための免疫原性ペプチドエピトープの同定に関しては重要な問題である。Kastr(J. Immunol. 152:3904~3912 (1994))は、モチーフ保有ペプチドが、対立遺伝子特異的HLAクラスI分子に結合するエピトープの90%の割合を占めることを示した。この研究において、すべての可能性のある9アミノ酸長のペプチドおよび8アミノ酸重複するペプチド(240ペプチド)(ヒトパピローマウイルス16型のE6およびE7タンパク質の全体配列をカバーする)は、異なる人種群間で高い頻度で発現される5つの対立遺伝子特異的HLA分子への結合を評価された。ペプチドのこの偏りのないセットは、HLAクラスIモチーフの予想値の評価を可能にした。240ペプチドのセットから、高親和性および中度の親和性で対立遺伝子特異的HLA分子に結合する22のペプチドが同定された。これらの22ペプチドの20(すなわち、91%)がモチーフ保有であった。従って、この研究は、ワクチンへの封入のためのペプチドエピトープの同定のためのモチーフの値を示す：モチーフを基礎とした同定技術の適用は、標的抗原タンパク質配列において可能性のあるエピトープの90%のスクリーニングを排除する。

## 【0082】

本発明のペプチドはまた、MHCクラスII DR分子に結合するエピトープを含み得る。クラスIとクラスIIHLA分子との間に有意な差異が存在する。この差異は、結合ポケットに関係するストリンジェントなサイズ制限およびモチーフ位置がクラスI分子に結合するペプチドに存在するが、ペプチドのN末端およびC末端に関係する、モチーフのサイズおよび結合フレーム位置の両方におけるより大きい程度の異種性が、クラスIIペプチドリガンドに存在するという事実に対応する。

## 【0083】

HLAクラスIIペプチドリガンドのこの増大した異種性は、HLAクラスII分子の結合グループの構造（そのクラスI対応物が両端で開かれるのと異なる）に起因する。HLAクラスII DRB<sup>\*</sup>0101-ペプチド複合体の結晶学的分析は、DRB<sup>\*</sup>0101と複合体化されたペプチドの位置1および位置6を占める残基が、最も重要なアンカー残基および最も深い疎水性ポケットに対応するP1位置で、DRBa<sup>\*</sup>0101分子上の2つの相補ポケットを使用することを示した（例えば、Madden, Ann. Rev. Immunol. 13: 587 (1995)を参照のこと）。他の研究はまた、種々の他のDR分子に結合するための重要なアンカー残基としてP6位置を示した。

## 【0084】

従って、本発明のペプチドは、任意のいくつかのHLAクラスIまたはクラスII特異的のアミノ酸モチーフの1つにより同定される（例えば、その全体が参考として本明細書中に援用される、米国特許出願09/226,775号および09/239,043号の表I~IIIを参照のこと）。いくつかの対立遺伝子特異的HLA抗原に結合する能力に対応するモチーフが存在する場合、それはスーパーモチーフといわれる。特定のアミノ酸スーパーモチーフを有するペプチドに結合する対立遺伝子特異的HLA分子は、総称してHLA「スーパータイプ」といわれる。

## 【0085】

(免疫応答刺激ペプチドアナログ)

一般に、CTL応答およびHTL応答は、全ての可能性のあるエピトープに対して指向されない。どちらかといえば、CTLおよびHTL応答は、わずかな「イムノドミナントな」決定基に制限される（Zinkernagelら、Adv. Immunol. 27:5159（1979）；Benninkら、J. Exp. Med. 168:1935～1939（1988）；Rawleら、J. Immunol. 146:3977～3984（1991））。イムノドミナンス（immunodominance）（Benacerrafら、Science 175:273～279（1972））は、特定のHLAタンパク質に選択的に結合する所定のエピトープの能力（決定基選択理論）（Vitielloら、J. Immunol. 131:1635（1983））；Rosenthalら、Nature 267:156～158（1977）または存在するTCR（T細胞レセプター）特異性により選択的に認識されること（レパートリー理論）（Klein, Immunology, The Science of Self of self Discrimination, 270～310頁（1982））のいずれかにより説明され得ることが認識されている。さらなる因子（大部分は処理事象に連結される）はまた、厳密な免疫原性を超える命令において重要な役割（多数の可能性のある決定基がイムノドミナントとして示される）を果たし得ることが実証されている（Sercarzら、Annu. Rev. Immunol. 11:729～766（1993））。

#### 【0086】

ドミナンスおよびサブドミナンスの概念は、感染性疾患および癌の両方の免疫療法に関する。例えば、慢性ウイルス疾患の経過において、サブドミナントなエピトープの補充は、特に優性なCTLまたはHTLの特異性が機能的な耐性、抑制、ウイルスの変異および他の機構により不活性化された場合、感染の首尾良い排除に重要であり得る（Francoら、Curr. Opin. Immunol. 7:524～531（1995））。癌抗原および腫瘍抗原の場合、少なくともいくつかの最高結合親和性のペプチドを認識するCTLは、機能的に不活性化され得る。より低い結合親和性のペプチドは、これらの時点で優先的に認識され、従って治療的または予防的な抗癌ワクチンにおいて好ましくあり得る。

## 【0087】

特に、公知の非ウイルス腫瘍関連抗原（TAA）由来の多数のエピトープが、中度の親和性（50～500 nMの範囲のIC50）でHLAクラスIに結合することが知られている。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）またはCTLにより認識された公知のTAAペプチドの15のうちの8つが50～500 nMの範囲で結合したことが見出されている。（これらのデータは、公知のウイルス抗原の90%が50 nM以下のIC50でHLAクラスI分子により結合され、一方わずかに約10%が50～500 nMの範囲で結合したという概算とは対照的である（Settler, J. Immunol. 153:558～5592（1994））。癌の状況において、この現象は、おそらく最高の結合ペプチドのいくつかを認識するCTLの排除または機能的阻害（おそらくT細胞寛容化事象による）に起因する。

## 【0088】

理論により束縛されることを意図しないが、ドミナントなエピトープに対してT細胞がクローン的に除去され得たので、サブドミナントなエピトープを選択することは、現存のT細胞が補充されることを可能にし得、次いでこれは治療的応答または予防的応答を導くと考えられる。しかし、サブドミナントなエピトープへのHLA分子の結合はしばしば、ドミナントなエピトープへの結合よりも強力でない。従って、例えば、より強力な応答を惹起するアナログペプチドを調製するため、1つ以上のHLA分子についての特定の免疫原性エピトープの結合親和性を調節し、これによりペプチドにより惹起された免疫応答を調節し得ることの必要性が存在する。この能力は、ペプチドを基礎とするワクチンおよび治療剤の有用性を大きく増強する。

## 【0089】

従って、スーパーファミリーのすべての対立遺伝子の中で適切な交差反応性を有するペプチドは、上記のスクリーニング手順により同定されるが、交差反応性は、常に可能なほど完全ではなく、そして特定の場合、ペプチドの交差反応性をさらに増大するための手順が有用であり得る；さらにこのような手順はまた、結合親和性またはペプチド安定性のようなペプチドの他の特性を改変するために用

いられ得る。所定のモチーフまたはスーパーモチーフ内のHLA対立遺伝子についてペプチドの交差反応性を管理する一般的な規則を樹立して、より広い（さもなければ改変された）HLA結合能力を獲得するために特定の目的のペプチドの構造の改変（すなわち、アナログ化）が実行され得る。より詳細には、最も広い交差反応性パターンを示すペプチドが、本明細書における教示に従って作製され得る。アナログ生成に関する現在の概念は、同時係続の米国特許出願09/226,775により詳細に記載される。

#### 【0090】

手短には、使用された戦略は、特定のHLAクラスIおよびクラスIIの分子への結合に関するモチーフまたはスーパーモチーフを利用する。このモチーフまたはスーパーモチーフは、一次アンカー、および多くの場合二次アンカーを有することにより規定される（米国特許出願第09/226,775号の表I～IIIを参照のこと）。アナログペプチドは、一次アンカー、二次アンカーまたは一次アンカー位置および二次アンカー位置でのアミノ酸残基の置換により作製され得る。一般的に、アナログはすでにモチーフまたはスーパーモチーフを保有するペプチドについて作製される。HLAクラスIおよびクラスIIの結合ペプチドについて規定されたスーパーモチーフおよびモチーフの好ましい二次アンカー残基が、それぞれ米国特許出願第09/226,775号の表IIおよびIIIに示される。

#### 【0091】

本発明に従う多数のモチーフまたはスーパーモチーフについて、それぞれのモチーフまたはスーパーモチーフに結合する対立遺伝子特異的なHLA分子またはHLAスーパータイプのメンバーへの結合に有害な残基が規定される（米国特許出願第09/226,775号の表IIおよびIIIを参照のこと）。従って、結合に有害なこのような残基の除去は、本明細書において記載される方法に従って実行され得る。例えば、A3スーパータイプの場合、このような有害な残基を有するすべてのペプチドが、分析されたペプチドの集団から除去されるとき、交差反応性の頻度は22%から37%へ増加する（I., Sidney, Hu. Immunol. 45:79 (1996)）。従って、所定のスーパーモチーフ

内でペプチドの交差反応性を改善するための1つの戦略は、単に、ペプチド内に存在する有害な1つ以上の残基を欠失すること、およびA1aのような小さい「中性の」残基（ペプチドのT細胞認識に影響し得ない）を置換することである。ペプチド内の決定残基の排除と一緒に、対立遺伝子特異的HLA分子またはスーパーファミリー内の複数のHLA分子に対する高親和性結合に関連する「好ましい」残基が挿入される場合、交差反応性の見こみの増強が期待される。

#### 【0092】

ワクチンとして用いた場合、アナログペプチドが、インビボにおいて、天然のエピトープに対してCTL応答を実際に惹起すること（または、クラスIIエピトープの場合、野生型ペプチドと交差反応するヘルパーT細胞を惹起しないこと）を保証するため、このアナログペプチドは、適切なHLA対立遺伝子の個体からインビトロでT細胞を免疫するために用いられ得る。その後、野生型ペプチドを感作した標的細胞の溶解を誘導する免疫細胞の能力が評価される。クラスIおよびクラスIIの両方の系において、内因的に産生された抗原がまた関連するT細胞により認識されるか否かを確認するために、適切な遺伝子で感染されるかまたはトランスフェクトされるかのいずれかをされた細胞を、標的として使用することが望ましい。

#### 【0093】

本発明の別の実施態様は、それによって交差反応性の細胞接着因子の適切な数を確認するために、弱い結合ペプチドのアナログを作製することである。500~50000nMの結合親和性を表し、そして1つまたは両方の位置で受容可能だが最適未満の一次アンカー残基を保有するクラスIペプチドは、それぞれのスーパータイプに従って好ましいアンカー残基の置換により「固定」され得る。次いで、アナログペプチドは、交差結合活性について試験され得る。

#### 【0094】

効果的なペプチドアナログを作製するための別の実施態様は、たとえば、液体環境中のペプチド安定性または溶解性に有害な影響を有する残基の置換を含む。この置換は、ペプチドエピトープの任意の位置で生じ得る。例えば、システイン(C)は、γアミノ酪酸の方を選んで置換され得る。その化学特性に起因して、



システインはジスルフィド架橋を形成する傾向を有し、そしてペプチドを構造的に十分変化し、結合能力を低下する。Cについての $\gamma$ アミノ酪酸置換は、この問題を緩和するだけでなく、特定の例において結合能力および架橋能力を実際に改善する(Setterら、Persistent Viral Infections (AhmedおよびChen編、1998))。  $\gamma$ アミノ酪酸でのシステインの置換は、ペプチドエピトープの任意の残基、すなわちアンカー位置または非アンカー位置のいずれでも生じ得る。

#### 【0095】

(発現ベクターおよびミニ遺伝子の構築)

本発明の発現ベクターは、抗原が発現され、そして適切なMHC分子に標的化されるように、生物体の適切な細胞において、目的の抗原(例えば、MHCクラスIエピトープまたはMHCクラスIIエピトープ) およびMHC標的化配列をコードする転写単位を発現し得る少なくとも1つのプロモーターエレメントを含む。例えば、発現ベクターがヒトのような哺乳動物に投与される場合、ヒト細胞内で機能するプロモーターエレメントが、発現ベクターに組み込まれる。本明細書において記載されるMHCクラスII標的化配列に融合したMHCクラスIIエピトープおよびMHCクラスIエピトープを発現するのに有用な発現ベクターの例は、実施例IVに記載されるpEP2ベクターである。

#### 【0096】

本発明は、組換え遺伝子の分野における慣用的な技術に依存する。本発明における使用の一般的方法を開示する基礎的なテキストには以下が挙げられる: Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (第2版、1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); および Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら、編、1994); Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (Gait編、1984); Kuipers, Nucleic Acids Research 18 (17): 5197 (1994);

Dueholm, J. Org. Chem. 59:5767~5773 (1994) ; Methods in Molecular Biology, 第20巻 (Agrawal編) ; ならびに Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes、例えば、第1部、第2章「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays」(1993)。

#### 【0097】

このミニ遺伝子は、2つまたは多数の異なるエピトープ（例えば、表1～8を参照のこと）から構成される。このエピトープをコードする核酸は、標準技術に従いミニ遺伝子にアセンブルされる。一般に、ミニ遺伝子エピトープをコードする核酸配列は、オリゴヌクレオチドプライマーを用いる増幅技術を用いて単離されるか、または化学的に合成される。組換えクローニング技術がまた、適切な場合に用いられ得る。所望のエピトープを増幅する（ミニ遺伝子にアセンブルするためにPCRを用いる場合）か、またはコードする（ミニ遺伝子にアセンブルするために合成オリゴヌクレオチドを使用する場合）かのいずれかのオリゴヌクレオチド配列が選択される。

#### 【0098】

プライマーを用いる増幅技術は、代表的にDNAまたはRNAから選んだエピトープをコードする配列を増幅および単離するために用いられる（米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号；PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innisら、編、1990)を参照のこと）。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）およびリガーゼ連鎖反応（LCR）のような方法が、直接、mRNA、cDNA、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーから、エピトープの核酸配列を増幅するために用いられ得る。制限エンドヌクレアーゼ部位は、プライマーに組み込まれ得る。PCR反応により増幅されるミニ遺伝子は、アガロー

スゲルから精製され得、そして適切なベクターにクローニングされ得る。

### 【0099】

合成的オリゴヌクレオチドはまた、ミニ遺伝子を構築するために用いられ得る。この方法は、遺伝子のセンス鎖および非センス鎖の両方を示す、一連の重複するオリゴヌクレオチドを用いて実行され得る。次いでこれらのDNAフラグメントはアニーリングされ、連結され、そしてクローニングされる。市販されていないオリゴヌクレオチドは、Van Devanterら、Nucleic Acids Res. 12:6159~6168 (1984)に記載の自動合成機を用いて、BeaucageおよびCaruthers, Tetrahedron Letts. 22:1859~1862 (1981)に最初に記載された固相ホスホルアミダイトリエステル法に従って、化学的に合成され得る。オリゴヌクレオチドの精製は、ネイティブアクリルアミドゲル電気泳動、または陰イオン交換HPLC (PearsonおよびReanier, J. Chrom. 255:137~149 (1983)に記載されるように)のいずれかによる。

### 【0100】

ミニ遺伝子のエピトープは、代表的に、直接転写のための強力なプロモーターならびにエンハンサーおよびポリアデニル化部位のような他の調節配列を含む発現ベクターにサブクローニングされる。適切なプロモーターは、当該分野で周知であり、そして例えば、SambrookらおよびAusubelらに記載される。哺乳動物細胞のための真核生物発現系は、当該分野で周知であり、そして市販されている。このようなプロモーターエレメントとしては、例えば、サイトメガロウイルス (CMV)、ラウス肉腫ウイルスLTRおよびSV40が挙げられる。

### 【0101】

発現ベクターは、代表的に、宿主細胞におけるミニ遺伝子の発現に必要な全てのさらなるエレメントを含む転写単位または発現カセットを含む。従って、代表的な発現カセットは、ミニ遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターおよび転写の有効なポリアデニル化に必要なシグナルを含む。このカセットのさらなるエレメントは、機能的なスプライスドナーおよびアクセプター部位を有するエンハ

ンサーおよびイントロンを含み得る。

#### 【0102】

プロモーター配列に加えて、発現カセットはまた、効率的な終止を提供するための構造遺伝子の下流の転写終止領域を含み得る。終止領域は、プロモーター配列と同じ遺伝子から得られても良いし、または異なる遺伝子から得られても良い。

#### 【0103】

細胞への遺伝情報を輸送するために用いられる特定の発現ベクターは、特に重要ではない。真核生物細胞における発現のために用いられる任意の従来のベクターがまた用いられ得る。真核生物ウイルス由来の調節エレメントを含む発現ベクターは、代表的に真核生物の発現ベクター、例えば、SV40ベクター、パピローマウイルスベクター、およびエプスタインバーウイルス由来のベクターにおいて用いられる。他の例示的な真核生物ベクターとしては以下が挙げられる：pMSG、pAV009/A+、pMTO10/A+、pMAMneo-5、パキキュロウイルスpDSVE、およびSV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳腺癌ウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、または真核生物細胞における発現のために有効性を示す他のプロモーターの指示下で、タンパク質の発現を可能にする任意の他のベクター。1つの実施態様において、このベクターpEP2が、本発明において用いられる。

#### 【0104】

代表的に発現ベクターに含まれる他のエレメントはまた、E. coliにおいて機能するレプリコン、組換えプラスミドを保有する細菌の選択を可能にする抗生物質耐性をコードする遺伝子、および真核生物配列の挿入を可能にするプラスミドの非必須領域における特有の制限部位を含む。選択される特定の抗生物質耐性遺伝子は、重要でなく、当該分野で公知の任意の多数の耐性遺伝子が適切である。原核生物配列は、必要であれば、好ましくは、それらが真核生物細胞におけるDNAの複製を妨害しないように選択される。

#### 【0105】

(インビボ投与)

本発明はまた、本発明の発現ベクターを個体に投与することにより免疫応答を刺激するための方法を提供する。免疫応答を刺激するための本発明の発現ベクターの投与は、利点がある。なぜなら、本発明の発現ベクターは、MHC分子に対してMHCエピトープを標的し、従って発現ベクターによりコードされる抗原により活性化されるCTLおよびHTLの数を増加させるからである。

#### 【0106】

最初に、本発明の発現ベクターは、所望の免疫応答を刺激する際に至適活性を有する発現ベクターを決定するためにマウスにおいてスクリーニングされる。従って最初の研究は、MHC標的化配列のマウス遺伝子を用いて可能な場所で行われる。本発明の発現ベクターの活性を決定する方法は、当該分野で周知であり、そして例えば、以下の実施例I IおよびI I Iに記載されるように、T細胞活性を測定するための<sup>3</sup>Hチミジンの取り込み、およびCTL活性を測定するための<sup>51</sup>Crの放出を含む。実施例I Vに記載の実験と類似の実験が免疫応答を刺激する活性を有する発現ベクターを決定するために実行される。活性を有する発現ベクターはさらにヒトにおいて試験される。コードされたマウス配列に対する有害な免疫学的応答の可能性を回避するため、活性を有する発現ベクターは、MHCクラスI I標的化配列がヒト遺伝子に由来するように改変される。例えば、種々のMHCクラスI I標的化配列を含む遺伝子のヒト相同体のアナログ領域の置換は、本発明の発現ベクターに置換される。MHCクラスI I標的化配列を含む遺伝子のこのようなヒト相同体の例は、図12～17に示される。ヒトMHCクラスI I標的化配列を含む発現ベクター（例えば、以下、実施例Iに記載されるベクター）は、ヒトにおいて免疫応答を刺激する活性について試験される。

#### 【0107】

本発明はまた、薬学的に受容可能なキャリアおよび本発明の発現ベクターを含む薬学的組成物に関する。薬学的に受容可能なキャリアは、当該分野で周知であり、そして以下を含む：水溶液もしくは非水溶液、懸濁液、および乳濁液（生理学的に緩衝化された生理食塩水、アルコール溶液／水性溶液または他の溶剤もしくはビヒクル（例えば、グリコール、グリセロール、オリーブ油のような油、ま

たは注射可能な有機エステル)を含む)。

#### 【0108】

薬学的に受容可能なキャリアは、例えば、発現ベクターを安定化するためか、または発現ベクターの吸収を増加するために作用する生理学的に受容可能な化合物を含み得る。このような生理学的に受容可能な化合物は、例えば、グルコース、スクロースまたはデキストランのような炭水化物、アスコルビン酸またはグルタチオンのような抗酸化剤、キレート剤、低分子量ポリペプチド、抗微生物剤、不活性ガスもしくはその他の安定化剤または賦形剤を含む。さらに、発現ベクターは、ペプチド、ポリペプチドおよび炭水化物のようなその他の成分と複合体化され得る。発現ベクターはまた、例えば、ワクチン銃を用いて、個体に投与され得る粒子またはビーズに複合体化され得る。当業者は、例えば、発現ベクターの投与の経路に依存して、生理学的に受容可能な化合物を含む、薬学的に受容可能なキャリアの選択を知っている。

#### 【0109】

本発明は、さらに、免疫応答を刺激するために本発明の発現ベクターを含む薬学的組成物を投与する方法に関する。この発現ベクターは、それぞれが参考として本明細書に援用される、Donnellyら(Ann. Rev. Immunol. 15:617~648(1997))；Felgnerら(米国特許第5,580,859号、1996年12月3日発行)；Felgner(米国特許第5,703,055号、1997年12月30日発行)；およびCarsonら(米国特許第5,679,647号、1997年10月21日発行)に記載のように、当該分野で周知の方法により投与される。1つの実施態様では、ミニ遺伝子が裸の核酸として投与される。

#### 【0110】

本発明の発現ベクターを含む薬学的組成物は、例えば、それぞれ、経口、経膈、経直腸、または静脈内、筋肉内、皮下、眼窩内、嚢内、腹腔内、槽内のような非経口的に、または例えば皮膚パッチもしくは経皮イオン浸透療法を用いる皮膚を通じる受動もしくは促進吸収によることを含む、種々の経路により、被験体中の免疫応答を刺激するために投与され得る。さらに、この組成物は、注射、挿管

または局所的に投与され得、後者は、例えば、軟膏もしくは粉末の直接付与による受動的であり得るか、または、例えば、鼻スプレーまたは吸入薬を用いて能動的であり得る。発現ベクターはまた、局所スプレーとして投与され得、この場合には、この組成物の1つの成分は、適切な噴霧剤である。この薬学的組成物はまた、所望であれば、リボソーム、ミクロスフェアまたはその他のポリマーマトリックス（各々が参考として本明細書に援用される、Felgnerら、米国特許第5,703,055号;Gregoriadis、Liposome Technology、第I~III巻（第2版、1993））中に取り込まれ得る。例えば、リン脂質またはその他の脂質からなるリボソームは、作製および投与することが比較的単純である、非毒性、生理学的に受容可能および代謝可能なキャリアである。

#### 【0111】

本発明の発現ベクターは、動物身体の組織の間隙空間に送達され得る（Felgnerら、米国特許第5,580,859号および同第5,703,055号）。本発明の発現ベクターの筋肉への投与は、皮内および皮下注射ならびに経皮投与を含み、投与の特に効果的な方法である。イオン浸透療法によるような経皮投与はまた、本発明の発現ベクターを筋肉に送達するための効果的な方法である。本発明の発現ベクターの表皮投与もまた採用され得る。表皮投与は、刺激原に対する免疫応答を刺激するために、表皮の最外層を機械的もしくは化学的に刺激することを含む（Carsonら、米国特許第5,679,647号）。

#### 【0112】

免疫応答を刺激するために、本発明の発現ベクターを投与するその他の効果的な方法は粘膜投与を含む（Carsonら、米国特許第5,679,647号）。粘膜投与のために、投与の最も効果的な方法は、発現ベクターおよび薬学的組成物を含む適切なエアロゾルの鼻内投与を含む。坐剤および局所調製物もまた、生殖器、膣および眼部位の粘膜組織への発現ベクターの送達のために効果的である。さらに、発現ベクターは、粒子に複合体化されそしてワクチン銃により投与され得る。

#### 【0113】

投与されるべき用量は投与の方法に依存し、そして一般に、約 $0.1\mu\text{g}\sim$ 約 $200\mu\text{g}$ の間である。例えば、用量は、約 $0.05\mu\text{g}/\text{kg}\sim$ 約 $50\text{mg}/\text{kg}$ 、特に約 $0.005\sim 5\text{mg}/\text{kg}$ であり得る。例えば、効果的な用量は、発現バクターの投与後、免疫応答を測定することにより決定され得る。例えば、発現バクターによりコードされるMHCクラスIIエピートープまたはMHCクラスIIエピートープに特異的な抗体の産生が、ELISAまたはその他の免疫学的アッセイを含む、当該分野で周知の方法により測定され得る。さらに、Tヘルパー細胞またはCTL応答の活性化が、当該分野で周知の方法により測定され得、例えば、T細胞活性化を測定するための $^3\text{H}$ チミジンの摂取およびCTL活性を測定するための $^{51}\text{Cr}$ の放出を含む（以下の実施例IIおよびIIIを参照のこと）。

#### 【0114】

本発明の発現バクターを含む薬学的組成物は、予防または治療目的のために、哺乳動物、特にヒトに投与され得る。本発明の発現バクターを用いて処置または予防され得る疾患の例は、HBV、HCV、HIVおよびCMVでの感染、ならびに前立腺癌、腎臓癌、頸部癌、リンパ腫、尖圭コンジロームおよび後天性免疫不全症候群（AIDS）を含む。

#### 【0115】

治療的適用では、本発明の発現バクターは、すでに、癌、自己免疫疾患を患うかまたはウイルスで感染した個体に投与される。疾患の潜伏期または急性期の個体が、すべてのユニバーサルMHCクラスIIエピートープを発現するバクターを含む本発明の発現バクターで、必要に応じて、他の処置とは別にまたそれと組み合わせて処置され得る。

#### 【0116】

治療および予防適用には、本発明の発現バクターを含む薬学的組成物は、抗原に対する効果的な免疫応答を惹起し、かつ疾患の徴候または症状を改善するに十分な量で患者に投与される。疾患の徴候または症状を改善するに十分である、投与するための発現バクターの量は、治療的に有効な用量と呼ばれる。治療的に有効な用量を達成するに十分な発現バクターの量は、本発明の発現バクターを含む



薬学的組成物、投与の様式、処置される疾患の状態および重篤度、患者の体重および健康の一般状態、ならびに担当医の診断に依存する。

#### 【0117】

本明細書に引用されるすべての刊行物および特許出願は、あたかも、各々個々の刊行物または特許出願が、詳細にかつ個々に参照によって援用されて示されるように、本明細書に参考として援用される。

#### 【0118】

前述の発明は、理解を明瞭にする目的で、説明および例によりある程度詳細に記載しているが、本発明の教示を考慮して、添付の請求項の思想および範囲を逸脱することなく、特定の変更および改変がそれになされ得ることは当業者に容易に明らかなである。

#### 【0119】

##### (実施例)

以下の実施例は、例示のみの目的で提供され、そして限定するものではない。当業者は、本質的に類似の結果を生じるように変更または改変され得る、種々の重要でないパラメーターを容易に認識する。

#### 【0120】

##### (実施例 I : MHC クラス II エピトープを含む発現ベクターの構築)

この実施例は、抗原が、MHC クラス II 分子を標的にするために用いられ得る MHC クラス II エピトープを含む、発現ベクターの構築を示す。

#### 【0121】

DNA 構築物を含む発現ベクターは、重複するオリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) および標準的な分子生物学の技法 (各々が本明細書に参考として援用される、Dieffenbach & Dveksler, PCR Primer: A Laboratory Manual (1995); Sambrook ら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, 1989)) を用いて調製された。

#### 【0122】

完全長の野生型 I i を生成するために、完全長の不変異体鎖を増幅し、クロー

ン化し、および配列決定し、そして3つの不変異体鎖構築物の構築に用いた。注記した場所を除いて、以下に列挙されたすべての構築物のcDNAの供給源は、Balb/c雄から作製されたMouse Spleen Marathon-Ready cDNAであった(Clontech; Palo Alto CA)。プライマー対は、オリゴヌクレオチドGCTAGCGCCGCCACCATGGATGACCAACGCGACCTC (配列番号40)、これは、mur I i-Fと称され、そしてNhe I部位、次いでコンセンサスKozak配列およびI i cDNAの5'末端を含む；およびオリゴヌクレオチドGGTACCTCACAGGGTGACTTGACCCAG (配列番号41)、これは、mur I i-Rと称され、そしてKpn I部位およびI iコード配列の3'末端を含む、であった。

#### 【0123】

PCR反応には、5  $\mu$  lの脾臓cDNAおよび250 nMの各プライマーを、各0.25 mMの各dNTP、および10 mMのKCl、10 mMの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、20 mMのTris-クロライド、pH 8.75、2 mMのMgSO<sub>4</sub>、0.1%のTRITON X-100および100  $\mu$  g/mlのウシ血清アルブミン(BSA)を含むPfuポリメラーゼ緩衝液中の2.5単位のPfuポリメラーゼをとまう100  $\mu$  l反応中で組み合わせた。Perkin/Elmer 9600 PCRマシン(Perkin Elmer; Foster City CA)を用い、そしてサイクリング条件は：95℃の1サイクル5分間、次いで95℃15秒間、52℃30秒間、および72℃1分間の30サイクルであった。このPCR反応物を、1%アガロースゲル上で泳動し、そして670塩基対の産物を切断し、Millipore Ultrafree-MCフィルター(Millipore; Bedford MA)によりスピニングすることにより精製し、そしてInvitrogen (San Diego, CA)からのpCR-Blunt中にクローン化した。個々のクローンを、配列決定によりスクリーニングし、そして正確なクローン(b I i #3と命名)を、ヘルパー構築物のテンプレートとして用いた。

#### 【0124】

I i タンパク質由来のすべての (pan) DR エピトープ配列および MHC I I 標的配列を含む DNA 構築物を調製した。この I i マウスタンパク質は、先に記載されており (Zhu & Jones, Nucleic Acids Res. 17:447~448 (1989))、これは参考として本明細書に援用される。簡単に記載すると、I i PADRE 構築物は、CLIP 領域を正確に置換する PADRE をもつ完全長 I i 配列を含む。この DNA 構築物は、不変異体鎖の 1~87 のアミノ酸をコードし、次いで 13 アミノ酸の PADRE 配列 (配列番号 38) および不変異体鎖 DNA 配列の残り (アミノ酸 101~215) が続く。この構築物を、連結されて最終構築物を生成した、2 つの重複する半分で増幅した。5' 半分を増幅するために用いた 2 つのプライマーは、mur I i -F、および I i PADRE-R と称されるオリゴヌクレオチド CAGGGTCCAGGCAGCCACGAACCTGGCCACAGGTTTGGCAGA (配列番号 42) である。この I i PADRE-R プライマーは、I i PADER のヌクレオチド 303~262 を含む。3' 半分は、I i PADRE-F と称され、そして I i PADRE のヌクレオチド 288~330 を含む、プライマー GGCTGCCTGGACCCTGAAGGCTGCCGCTATGTCCATGGATAAC (配列番号 43) ; および mur I i -R で増幅した。PCR 条件は上記と同じであり、そして 2 つの半分を、上記のようにアガロースゲル電気泳動により単離した。

#### 【0125】

10  $\mu$  l の各 PCR 産物を、5 サイクルについて 50  $^{\circ}$ C のアニーリング温度で 100  $\mu$  l PCR 反応中で組み合わせ、完全長テンプレートを生成した。プライマーの mur I i -F および mur I i -R を添加し、そして 25 のさらなるサイクルを実施した。完全長の I i PADRE 産物を単離し、クローン化し、そして上記のように配列決定した。この構築物は、I i の CLIP 配列を置換する汎 DR エピトープ配列をもつマウス I i 遺伝子を含む (図 1)。

#### 【0126】

一連の複数 MHC クラス II エピトープに融合した、I i の細胞質ドメイン、膜貫通ドメインおよび管腔ドメインの一部を含む、I 80 T と称する DNA 構築

物を構築した(図2)。簡単に記載すると、一連の複数MHCクラスIIエпитオプを、3つの重複するオリゴヌクレオチド(オリゴ)を用いて構築した。各オリゴは、15ヌクレオチドだけその隣と重複し、そしてこの最終MHCクラスIIエピトープ列を、PCRを用いる3セットの反応で、この重複オリゴヌクレオチドを伸長することによりアセンブルした。この3つのオリゴヌクレオチドは：オリゴ1、ヌクレオチド241～310、CTTCGCATGAAGCTTATCAGCCAGGCTGTGCACGCCGCTCACGCCGAAATCAA CGAAGCTGGAAGAACCC(配列番号44)；

オリゴ2、ヌクレオチド364～295、

TTCTGGTCAGCAGAAAGAACAGGATAGGAGCGTTTG  
GAGGGCGATAAGCTGGAGGGGTTCTTCCAGCTTC(配  
列番号45)；および

オリゴ3、ヌクレオチド350～42、

TTCTGCTGACCCAGAAATCCTGACAAATCCCCAGTCCC  
TGGACGCCAAGTTCGTGGCTGCCTGGACCCTGAAG(配  
列番号46)であった。

### 【0127】

最初のPCR反応には、5 $\mu$ gのオリゴ1および2を、Pfuポリメラーゼを含む100 $\mu$ l反応物中で組み合わせた。Perkin/Elmer 9600 PCRマシンを用い、そして用いたアニーリング温度は45℃であった。PCR産物をゲル精製し、そしてオリゴ3と、オリゴ1および2のPCR産物を含む第2の反応物をアニールし、そして「メガプライマー」として用いられるべき完全長産物のゲル精製の前に、10サイクルの間伸長した。

### 【0128】

このI80T構築物は、murI- $\alpha$ およびメガプライマーでbIi#3を増幅することにより作製した。サイクリング条件は：95℃の1サイクル5分間、次いで95℃15秒間、37℃30秒間、および72℃1分間の5サイクルであった。プライマーHelpepRを添加し、そしてさらなる25サイクルを、47℃に高められたアニーリング温度で実施した。このHelpepRプライ

マーGGTACCTCAAGCGGCAGCCTTCAGGGTCCAGGCA  
(配列番号47)はヌクレオチド438~405に対応する。上記のように、完全長I80T産物を単離し、クローン化し、そして配列決定する。

# 【0129】

このI80T構築物(図2)は、オボアルブミンのアミノ酸残基323~339(IleSerGlnAlaValHisAlaAlaHisAlaGluIleAsnGluAlaGlyArg;配列番号48);HBVコア抗原のアミノ酸残基128~141(アミノ酸ThrProProAlaTyrArgProProAsnAlaProIleLeu;配列番号49);HBV envのアミノ酸残基182~196(アミノ酸PhePheLeuLeuThrArgIleLeuThrIleProGlnSerLeuAsp;配列番号50);および配列番号38で示される汎DR配列、に対応する一連の複数のMHCクラスIIエピトープに融合した、細胞質ドメイン、膜貫通ドメインおよび管腔ドメインの一部を含む、Iiのアミノ酸残基1~80をコードする。

# 【0130】

図2に示される、MHCクラスIIエピトープ列に融合した、Iiの細胞質ドメイン、膜貫通ドメインおよび管腔ドメインの一部、ならびにIiの三量体化領域をコードするIiのアミノ酸残基101~215を含むDNA構築物を生成した(図3)。IiThfullと称するこの構築物は、(CLIPを置換する)MHCクラスIIエピトープ列および不変異体鎖の残り(アミノ酸101~215)に続く不変異体鎖の最初の80のアミノ酸をコードする。要約すれば、この構築物は、アニールされ、そしてPCRにより伸長されて最終産物を生じる、2つの重複する半分として生成された。

# 【0131】

IiThfullの5'末端を、murIi-F(配列番号40)およびTh-Pad-RでI80Tを増幅することにより作製した。このTh-Pad-RプライマーAGCGGCAGCCTTCAGGGTC(配列番号51)は、ヌクレオチド429~411に対応する。3'の半分は、IiPADRE-FおよびmurIi-R(配列番号41)でbIi#3を増幅することにより作製した。

このI i P A D R E - FプライマーG G C T G C C T G G A C C C T G A A G G C T G C C G C T A T G T C C A T G G A T A A C (配列番号52)は、ヌクレオチド402~444に対応する。各PCR産物をゲル精製し、そして混合し、次いでPCRの5サイクルにより変性し、アニールし、そして伸長した。プライマーm u r I i - F (配列番号40)およびm u r I i - R (配列番号41)を添加し、そして別の25サイクルを実施した。完全長産物をゲル精製し、クロン化し、そして配列決定した。

### 【0132】

以下に記載の残りの構築物のすべては、図18に示されるスキームに本質的に従って作製された。要約すれば、各特定の構築物について以下に称される、プライマー対1Fプラス1Rを用いて、特定のシグナル配列を増幅し、そしてMHCクラスIIエピトープ列の5'末端に同一である重複する15塩基対テイルを含んだ。プライマー対T h - o v a - F、A T C A G C C A G G C T G T G C A C G C (配列番号53)、プラスT h - P a d - R (配列番号51)を用いてMHCクラスIIエピトープ列を増幅した。15塩基対の重複、および標的化シグナルを含む特異的膜貫通ならびに細胞質テイルを、プライマー対2Fプラス2Rで増幅した。

### 【0133】

各cDNAの3つすべての断片は、以下の条件を用いて増幅した：95℃の1サイクル5分間、次いで95℃15秒間、52℃30秒間、および72℃1分間の30サイクル。3つのフラグメントの各々をアガロースゲル精製し、そしてシグナル配列およびMHCクラスII列フラグメントを組み合わせ、そして第2のPCRにおける5サイクルにより連結した。5サイクルの後、プライマー1FおよびT h - P a d - Rを、さらなる25サイクルについて添加し、そしてPCR産物をゲル精製した。このシグナル配列プラスMHCクラスIIエピトープ列フラグメントを、最終PCRのために、膜貫通プラス細胞質テイルフラグメントと組み合わせた。5サイクルの後、プライマー1Fプラス2Rを、さらなる25サイクルについて添加し、そして産物をゲル精製し、クロン化し、そして配列決定した。

## 【0134】

図2に示すTヘルパーエпитープ列に融合したマウス免疫グロブリン $\kappa$ シグナル配列、およびLAMP-1の膜貫通および細胞質ドメインを含むDNA構築物を生成し(図4)(Grangerら、J. Biol. Chem. 265:12036~12043(1990))、これは参考として援用される(マウスLAMP-1 GenBank受託番号M32015)。 $\kappa$ AMP-Thと称するこの構築物は、コンセンサスマウス免疫グロブリン $\kappa$ シグナル配列を含み、そして図18に示されるように、完全長免疫グロブリン $\kappa$ を含むプラスミドから増幅された。用いたプライマー1Fは、KappaSig-Fと称するオリゴヌクレオチド、GCTAGCGCCGCCACCATGGGAATGCAG(配列番号54)であった。

## 【0135】

用いたプライマー1Rは、Kappa-Th-Rと称するオリゴヌクレオチド、CACAGCCTGGCTGATTCTCTGGACCC(配列番号55)であった。

## 【0136】

用いたプライマー2Fは、PAD/LAMP-Fと称するオリゴヌクレオチド、CTGAAGGCTGCCGCTAACAACATGTTGATCCCC(配列番号56)であった。用いたプライマー2Rは、LAMP-CYTORと称するオリゴヌクレオチド、GGTACCCTAGATGGTCTGATAGCC(配列番号57)であった。

## 【0137】

図2に示すMHCクラスIIエпитープ列に融合したH2-Mのシグナル配列、ならびにH2-Mの膜貫通および細胞質ドメインを含むDNA構築物を生成した(図5)。このマウスH2-M遺伝子は、先に記載され、Pelerauxら、Immunogenetics 43:204~214(1996)、これは本明細書に参考として援用される。この構築物は、H2M-Thと称され、そして図18に示されるように構築された。用いたプライマー1Fは、H2-Mb-1Fと称されるオリゴヌクレオチド、GCC GCT AGC GCC GCC

ACC ATG GCT GCA CTC TGG (配列番号58)であった。  
 。用いたプライマー1Rは、H2-Mb-1Rと称されるオリゴヌクレオチド、  
 CAC AGC CTG GCT GAT CCC CAT ACA GTG  
 CAG (配列番号59)であった。用いたプライマー2Fは、H2-Mb-2F  
 と称されるオリゴヌクレオチド、CTG AAG GCT GCC GCT A  
 AG GTC TCT GTG TCT (配列番号60)であった。用いたプ  
 ライマー2Rは、H2-Mb-2Rと称されるオリゴヌクレオチド、GCG GG  
 T ACC CTA ATG CCG TCC TTC (配列番号61)であ  
 った。

### 【0138】

図2に示すMHCクラスIIエピートープ列に融合したH2-DOのシグナル配  
 列、ならびにH2-DOの膜貫通および細胞質ドメインを含むDNA構築物を生  
 成した(図6)。このマウスH2-M遺伝子は、先に記載され(Larhamm  
 arら、J. Biol. Chem. 260:14111~14119 (1985  
 ))、これは、本明細書に参考として援用される(GenBank受託番号M1  
 9423)。H2O-Thと称されるこの構築物は、図18に示されるように構  
 築された。用いたプライマー1Fは、H2-Ob-1Fと称されるオリゴヌクレ  
 オチド、GCG GCT AGC GCC GCC ACC ATG GGC  
 GCT GGG AGG (配列番号62)であった。用いたプライマー1Rは、  
 H2-Ob-1Rと称されるオリゴヌクレオチド、TGC ACA GCC T  
 GG CTG ATG GAA TCC AGC CTC (配列番号63)であ  
 った。用いたプライマー2Fは、H2-Ob-2Fと称されるオリゴヌクレオチ  
 ド、CTG AAG GCT GCC GCT ATA CTG AGT GG  
 A GCT (配列番号64)であった。用いたプライマー2Rは、H2-Ob-  
 2Rと称されるオリゴヌクレオチド、GCC GGT ACC TCA TGT  
 GAC ATG TCC CG (配列番号65)であった。

### 【0139】

インフルエンザマトリックスタンパク質のアミノ末端に融合した、汎DRエ  
 ピトープ配列(配列番号38)を含むDNA構築物を生成する(図7)。PADR



E-インフルエンザマトリックスと称されるこの構築物は、インフルエンザマトリックスコード配列のアミノ末端に付着した、ユニバーサルMHCクラスIIエピトープPADREを含む。この構築物は、5'末端プライマー上の長プライマーを用いて作製される。この5'プライマーは、オリゴヌクレオチド、GCTAGCGCGCCGCCACCATGGCCAAAGTTCGTGGCTGCCTGGA  
CCCTGAAGGCTGCCGCTATGAGTCTTCTAACCGAGG  
TCGA (配列番号66) である。3'プライマーは、オリゴヌクレオチド、TCACTTGAATCGCTGCATCTGCACCCCCCAT (配列番号67) である。America Type Tissue Collection (ATCC) からのインフルエンザウイルスを、マトリックスコード領域の供給源として用い (Perdueら、Science 279:393~396 (1998))、これは参考として本明細書に援用される (GenBank受託番号AF036358)。

#### 【0140】

HBV-S抗原のアミノ末端に融合した汎DRエピトープ配列 (配列番号38) を含むDNA構築物を生成した (図8)。この構築物は、PADRE-HBV-sと称され、そしてB型肝炎表面抗原のアミノ末端上にPADREを付加するために、2つの重複するオリゴヌクレオチドをアニールすることにより生成した (Michelら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7708~7712 (1984); Michelら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:5307~5311 (1995))、その各々は、参考として本明細書に援用される。1つのオリゴヌクレオチドは、GCTAGCGCGCCGCCACCATGGCCAAAGTTCGTGGCTGCCTGGACC  
CTGAAGGCTGCCGCTC (配列番号68) であった。第2のオリゴヌクレオチドは、CTCGAGAGCGGCAGCCTTCAGGGTCCAGG  
CAGCCACGAACCTTGGCCATGGTGGCGGCG (配列番号69) であった。アニールされたとき、このオリゴは、NheIおよびXhoI粘着末端を有する。このオリゴを、100℃まで熱し、そしてゆっくり室温まで冷却してアニールする。3部連結は、HBV-s抗原を含むXhoI-KpnIフラ

グメントをもつPADREを、発現ベクターのNheIプラスKpnI部位中に連結した。

# 【0141】

図2に示されるMHCクラスIIエpiteope列に融合したI g- $\alpha$ のシグナル配列、およびI g- $\alpha$ の膜貫通および細胞質ドメインを含むDNA構築物を生成した(図9)。このマウスI g- $\alpha$ 遺伝子は、先に記載されており(Kashiwamuraら、J. Immunol. 145:337~343(1990))、これは、参考として本明細書に援用される(GenBank受託番号M31773)。I g- $\alpha$ Thと称されるこの構築物は、図18に示されるように構築された。用いたプライマー1Fは、I g- $\alpha$ -1Fと称されるオリゴヌクレオチド、GCG GCT AGC GCC GCC ACC ATG CCA GGG GGT CTA(配列番号70)であった。用いたプライマー1Rは、I g- $\alpha$ -1Rと称されるオリゴヌクレオチドGCA CAG CCT GGC TGA TGG CCT GGC ATC CGG(配列番号71)であった。用いたプライマー2Fは、I g- $\alpha$ -2Fと称されるオリゴヌクレオチド、CTG AAG GCT GCC GCT GGG ATC ATC TTG CTG(配列番号72)であった。用いたプライマー2Rは、I g- $\alpha$ -2Rと称されるオリゴヌクレオチド、GCG GGT ACC TCA TGG CTT TTC CAG CTG(配列番号73)であった。

# 【0142】

図2に示されるMHCクラスII列に融合したI g- $\beta$ のシグナル配列、およびI g- $\beta$ の膜貫通および細胞質ドメインを含むDNA構築物を生成した(図10)。このI g- $\beta$ 配列は、マウスのB29遺伝子であり、そして先に記載される(Hermansonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6890~6894(1988))、これは、参考として本明細書に援用される(GenBank受託番号J03857)。I g- $\beta$ Thと称されるこの構築物は、図18に示されるように構築された。用いたプライマー1Fは、B29-1F(33マー)と称されるオリゴヌクレオチド、GCG GCT AGC GCC GCC ACC ATG GCC ACA CTG GTG(配列番号7

4)であった。用いたプライマー1Rは、B29-1R(30マー)と称されるオリゴヌクレオチド、CAC AGC CTG GCT GAT CGG CTC ACC TGA GAA(配列番号75)であった。用いたプライマー2Fは、B292F(30マー)と称されるオリゴヌクレオチド、CTG AAG GCT GCC GCT ATT ATC TTG ATC CAG(配列番号76)であった。用いたプライマー2Rは、B29-2R(27マー)と称されるオリゴヌクレオチド、GCC GGT ACC TCA TTC CTG GCC TGG ATG(配列番号77)であった。

#### 【0143】

図2に示されるMHCクラスIIエピトープ列に融合した $\kappa$ 免疫グロブリンのシグナル配列を含むDNA構築物を構築した(図11)。この構築物は、SigThと称され、そして $\kappa$ LAMP-Th構築物(図4に示される)を用いること、およびプライマー対KappaSig-F(配列番号54)プラスHelp-epr(配列番号47)で増幅しSigThを作製することにより生成した。SigThは、Tヘルパーエピトープ列に融合し、そして翻訳停止コドンで終わる $\kappa$ 免疫グロブリンシグナル配列を含む。

#### 【0144】

マウス配列を有する上記に記載の構築物に対応するヒト配列をコードする構築物を、マウス配列をヒト配列で置換することにより調製する。要約すれば、図1に対応するIiPADRE構築物には、ヒトIi遺伝子HLA-DR配列(図12)(GenBank受託番号X00497 M14765)からのアミノ酸残基1~80を、PADREに融合されたマウスIi配列の代わりに置き換え、ヒト不変異体鎖HLA-DRアミノ酸残基114~223が続く。図2に対応するI80T構築物には、Iiのヒト配列からのアミノ酸残基1~80の後にMHCクラスIIエピトープ列が続く。図3に対応するIiThfull構築物には、MHCクラスIIエピトープ列に融合される、Iiのヒト配列からのアミノ酸残基1~80の後にヒト不変異体鎖アミノ酸残基114~223が続く。

#### 【0145】

LAMP-Th構築物について、図4と同様に、ヒトLAMP-1(図13)

(GenBank登録番号J04182)のアミノ酸残基1～19(ヌクレオチド11～67)によってコードされるシグナル配列(これは、MHCクラスIIエピトープストリングに融合される)に続いて、ヒトLAMP-1のアミノ酸残基380～416によってコードされる膜貫通領域(ヌクレオチド1163～1213)および細胞質テイル領域(ヌクレオチド1214～1258)が存在する。

#### 【0146】

図5に対応するHLA-DM-Th構築物について、ヒトHLA-DMB(図14)(GenBank登録番号U15085)のアミノ酸残基1～17(ヌクレオチド1～51)によってコードされるシグナル配列(これは、MHCクラスIIエピトープストリングに融合されている)に続いて、ヒトHLA-DMBのアミノ酸残基216～263によってコードされる膜貫通領域(ヌクレオチド646～720)および細胞質テイル領域(ヌクレオチド721～792)が存在する。

#### 【0147】

図6に対応するHLA-DO-Th構築物について、ヒトHLA-DO(図15)(GenBank登録番号L29472 J02736 N00052)のアミノ酸残基1～21(ヌクレオチド1～63)によってコードされるシグナル配列(これは、MHCクラスIIエピトープストリングに融合されている)に続いて、ヒトHLA-DOのアミノ酸残基223～273によってコードされる膜貫通領域(ヌクレオチド685～735)および細胞質テイル領域(ヌクレオチド736～819)が存在する。

#### 【0148】

図9に対応するIg-αTh構築物について、ヒトIg-αMB-1(図16)(GenBank登録番号U05259)のアミノ酸残基1～29(ヌクレオチド1～87)によってコードされるシグナル配列(これは、MHCクラスIIエピトープストリングに融合されている)に続いて、ヒトIg-αMB-1のアミノ酸残基142～226によってコードされる膜貫通領域(ヌクレオチド24～498)および細胞質テイル領域(ヌクレオチド499～678)が存在

する。

### 【0149】

図10に対応するI g- $\beta$ Th構築物について、ヒトI g- $\beta$  B29 (図17) (GenBank登録番号M80461) のアミノ酸残基1-28 (ヌクレオチド17-100) によってコードされるシグナル配列 (これは、MHCクラスIIエピトープストリングに融合されている) に続いて、ヒトI g- $\beta$ のアミノ酸残基156-229によってコードされる膜貫通領域 (ヌクレオチド500-547) および細胞質テイル領域 (ヌクレオチド548-703) が存在する。

### 【0150】

図11に示されるSigTh構築物は、マウスおよびヒトにおいて使用され得る。あるいは、シグナル配列を含む適切なヒト遺伝子に由来するシグナル配列は、SigTh構築物においてマウス $\kappa$ イムノグロブリン配列について置換され得る。

### 【0151】

図7に示されるPADRE-インフルエンザマトリクス構築物および図8に示されるPADRE-HBV構築物は、マウスおよびヒトにおいて使用され得る。

### 【0152】

上記に記載されるDNA構築物のいくつかを、ベクターpEP2 (図19; 配列番号35) 中にクローニングした。pEP2ベクターを、二連のCMVプロモーターを含むように構築した。このpEP2ベクターは、InvitrogenからのpcDNA3.1 (-) Myc-His AのバックボーンおよびClontechからのpIRES1hygを使用した。pIRES1hygからのCMV転写物単位を改変されたpcDNAベクターに対して移動させる前に、両方のベクターに対して、変化を施した。

### 【0153】

このpcDNA3.1 (-) Myc-His Aベクター (<http://www.invitrogen.com>) を改変した。手短には、このPvuIIフラグメント (ヌクレオチド1342-3508) を欠失させた。アンピシリン

耐性遺伝子（ヌクレオチド4404-5412）を含むA B s p H Iフラグメントを切り出した。このアンピシリン耐性遺伝子を、pUC4K（GenBank登録番号X06404）からのカナマイシン耐性遺伝子に置き換えた。pUC4Kを、以下のプライマーセットを用いて増幅した：TCTGATGTTACATTGCAACAAG（配列番号78）（ヌクレオチド1621-1601）およびGCGCACTCATGATGCTCTGCCAGTGTTACAACC（配列番号79）（ヌクレオチド682-702および5'末端側のB s p H I制限部位の付加）。このPCR産物をB s p H Iで消化し、そしてB s p H Iを用いて消化したベクターへと連結した。ヌクレオチド905でのP m e I部位と、ヌクレオチド947でのE c o R V部位との間の領域を欠失させた。次いで、このベクターをP m e I（ヌクレオチド1076での切断）およびA p a I（ヌクレオチド1004での切断）を用いて消化し、接着末端にてクレノウ充填し、そして連結した。ヌクレオチド994でのK p n I部位を、K p n Iで消化し、そしてクレノウDNAポリメラーゼを用いて末端を充填し、そして連結することによって欠失させた。CMV（GenBank登録番号M21295、ヌクレオチド635-1461）からのイントロンA配列を、以下のプライマーセットを用いてCMV DNAを増幅することによって付加した：GCGTCTAGAGTAAGTACCGCCTATAGACTC（配列番号80）（ヌクレオチド635-655および5'末端におけるX b a I部位）およびCCGGCTAGCCCTGCAGAAAAGACCCATGGAA（配列番号81）（ヌクレオチド1461-1441および3'末端におけるN h e I部位）。このPCR産物を、X b a IおよびN h e Iを用いて消化し、そしてこのベクターのN h e I部位（もとのp c DNAベクターのヌクレオチド895）へと連結し、その結果、このN h e I部位が、そのイントロンの3'末端に存在した。

#### 【0154】

p I R E S 1 h y gベクター（GenBank登録番号U89672、C l o n t e c h）を改変するために、K p n I部位（ヌクレオチド911）を、切断し、そしてクレノウを用いて充填することによって欠失させた。このプラスミドをN o t I（ヌクレオチド1254）およびX b a I（ヌクレオチド3196）

を用いて切断し、そしてポリリンカーオリゴをその部位へと挿入した。このポリリンカーを、以下の2つのオリゴをアニールさせることによって形成した：GCCGCAAGGAAAAAATCTAGAGTCGGCCATAGACTAATGCCGGTACCG（配列番号82）およびCTAGCGGTACCGGCATTAGTCTATGGCCCGACTCTAGATTTTTTCTCTGC（配列番号83）。得られるプラスミドを、HincIIを用いて切断し、そしてHincII部位234と3538との間のフラグメントを単離し、そして改変したpcDNAベクターへと連結した。このフラグメントは、CMVプロモーター、イントロン、ポリリンカーおよびポリアデニル化シグナルを含む。

#### 【0155】

pIRES<sub>h</sub>yg片およびpcDNA片を合わせてpEP2を形成した。改変したpcDNA3.1（-）Myc-His Aベクターを、PvuIIを用いて部分的に消化して、pcDNAポリアデニル化シグナルの切断下流を有する直鎖状のフラグメントを単離した（他のPvuII部位は、CMVイントロンである）。改変されたpIRES<sub>h</sub>ygベクターからのHincIIフラグメントを、PvuII切断ベクターへと連結した。pcDNAに由来する転写単位からのポリアデニル化シグナルを、EcoRI（pcDNAヌクレオチド955）およびXhoI（pIRES<sub>h</sub>ygヌクレオチド3472）を用いて消化することによって欠失させ、そして合成ポリアデニル化配列に置き換えた。この合成ポリアデニル化シグナルは、Levittrら、Genes and Development 3:1019-1025（1989）に記載されている。

#### 【0156】

2つのオリゴをアニールして、EcoRIおよびXhoIの接着末端を有するポリリンカーおよびポリアデニル化シグナルを含む1つのフラグメントを生成した。このオリゴは、以下のとおりであった：AATTCGGATATCCAAGCTTGATGAATAAAAGATCAGAGCTCTAGTGATCTGTGTGTTGGTTTTTTTGTGTGC（配列番号84）およびTCGAGCACACAAAAAACCAACACACAGATCACTAGAGCTCTGATCTTTTTTATTCATCAAGCTTGATATCCG（配列番号

85)。

# 【0157】

得られたベクターを、pEP2と命名し、そしてこのベクターは2つの別個の転写単位を含む。両方の転写単位は、同じCMVプロモーターを使用するが、各々は、異なるイントロン、ポリリンカーおよびポリアデニル化配列を含む。

# 【0158】

pEP2ベクターは、2つの転写単位を含む。この第一の転写単位は、当初はpcDNA(図19におけるヌクレオチド210-862)からのCMVプロモーター、CMVイントロンA配列(図19におけるヌクレオチド900-1728)、ポリリンカークロニング部位(図19におけるヌクレオチド1740-1760)および合成ポリアデニル化シグナル(図19におけるヌクレオチド1764-1769)を含む。この第二の転写単位(これは、当初はpIRES1hygに由来した)は、CMVプロモーター(図19におけるヌクレオチド3165-2493)、イントロン配列(図19におけるヌクレオチド2464-2173)、ポリリンカークロン部位(図19におけるヌクレオチド2126-2095)およびウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル(図19におけるヌクレオチド1979-1974)を含む。カナマイシン耐性遺伝子は、ヌクレオチド4965-4061(図19)においてコードされる。

# 【0159】

上記のDNA構築物を、NheIおよびKpnIを用いて消化し、そしてpEP2(第二転写単位)のXbaIおよびKpnI部位中にクロニングした。

# 【0160】

さらなるベクターもまた構築した。MHCクラスIエビトープとMHCクラスIIエビトープとの同時発現の効果について試験するために、9つのMHCクラスIエビトープを含むインサートを生成し、AOSと命名した。このAOSインサートを、ベクターpMIN.0(図20;配列番号36)においてまず構築した。手短には、このAOSインサートは、9つのMHCクラスIエビトープ(HLA-A2によって制限される6つおよびHLA-A11によって制限される3つ)およびユニバーサルMHCクラスIIエビトープPADREを含む。このベ



クターpMIN. 0は、HBV、HIVからのエピトープおよびマウスオボアルブミンエピトープを含む。このMHCクラスIエピトープは、pMIN. 0において、以下の順で現れる。:

ヌクレオチドATG CAG GTG CAG ATC CAG AGC CTG TTT CTG CTC CTC CTG TGG GTG CCC GGG TCC AGA GGA (配列番号87) によってコードされるコンセンサスマウスIg $\kappa$ シグナル配列 (pMIN. 0アミノ酸残基1-20、ヌクレオチド16-81) MQVQIQSLFLLLWVPGSRG (配列番号86) ;

ヌクレオチドCAC ACC CTG TGG AAG GCC GGA ATC CTG TAT AAG (配列番号89) によってコードされるHBV pol 149-159 (A11制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基21-31、ヌクレオチド82-114) HTLWKAGILYK (配列番号88) ;ヌクレオチドGCC AAG TTC GTG GCT GCC TGG ACC CTG AAG GCT GCC GCT (配列番号90) によってコードされるPADRE-ユニバーサルMHCクラスIIエピトープ (pMIN. 0 アミノ酸残基32-45、ヌクレオチド115-153) AKFVAAWTLKAAA (配列番号38) ;ヌクレオチドTTC CTG CCT AGC GAT TTC TTT CCT AGC GTG (配列番号92) によってコードされるHBVコア18-27 (A2制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基46-55、ヌクレオチド154-183) FLPSDFFPSPV (配列番号91) ;ヌクレオチドAAG CTG ACC CCA CTG TGC GTG ACC CTG (配列番号94) によってコードされるHIV env 120-128 (A2制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基56-64、ヌクレオチド184-210) KLTPLCVTL (配列番号93) ;ヌクレオチド TAT ATG GAT GAC GTG GTG CTG GGA GCC (配列番号96) によってコードされるHBV pol 551-559 (A2制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基65-73、ヌクレオチド211-237) YMDDVVLGA (配列番号95) ;ヌクレオチドAGC AT

C A T C A A C T T C G A G A A G C T G (配列番号98) によってコードされるマウスオボアルブミン257-264 (K<sup>b</sup>制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基74-81、ヌクレオチド238-261) S I I N F E K L (配列番号97) ;ヌクレオチド G G A C T G T C C A G A T A C G T G G C T A G G C T G (配列番号100) によってコードされるHBV p o l 455-463 (A2制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基82-90、ヌクレオチド262-288) G L S R Y V A R L (配列番号99) ;ヌクレオチド A T C C T G A A G G A G C C T G T G C A C G G C G T G (配列番号102) によってコードされるHIV p o l 476-84 (A2制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基91-99、ヌクレオチド289-315) I L K E P V H G V (配列番号101) ;ヌクレオチドT C C A C C C T G C C A G A G A C C A C C G T G G T G A G G A G A (配列番号104) によってコードされるHBVコア141-151 (A11制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基100-110、ヌクレオチド316-348) S T L P E T T V V R R (配列番号103) ;ヌクレオチドA C C G T G T A C T A T G G A G T G C C T G T G T G G A A G (配列番号106) によってコードされるHIV e n v 49-58 (A11制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基111-120、ヌクレオチド349-378) T V Y Y G V P V W K (配列番号105) ;およびヌクレオチド T G G C T G A G C C T G C T G G T G C C C T T T G T G (配列番号108) によってコードされるHBV e n v 335-343 (A2制限される) (pMIN. 0 アミノ酸残基121-129、ヌクレオチド378-405) W L S L L V P F V (配列番号107) 。

# 【0161】

pMIN. 0ベクターは、K p n I制限部位 (pMIN. 0ヌクレオチド406-411) およびN h e I制限部位 (pMIN. 0ヌクレオチド1-6) を有する。このpMIN. 0ベクターは、コンセンサスK o z a k配列 (ヌクレオチド7-18) (G C C G C C A C C A T G ;配列番号109) およびマウスκ I g -軽鎖シグナル配列に続いて10個のMHCクラスIエピトープのストリン

グおよび1つのユニバーサルMHCクラスIIエピトープを含む。pMIN. 0配列は、pcDNA 3.1 Myc-HisベクターによってコードされるMycおよびHisの抗体エピトープタグに融合されたオープンリーディングフレームをコードする。このpMIN. 0ベクターを、8つのオリゴヌクレオチドを用いて構築した。

# 【0162】

## Min1オリゴ

GAGGAGCAGAAACAGGCTCTGGATCTGCACCTGCAT  
TCCCATGGTGGCGGCGCTAGCAAGCTTCTTGCGC (配  
列番号110) ;

## Min2オリゴ

CCTGTTTCTGCTCCTCCTGTGGGTGCCCGGGTCCAG  
AGGACACACCCTGTGGAAGGCCGGAATCCTGTATA (配  
列番号111) ;

## Min3オリゴ

TCGCTAGGCAGGAAAGCGGCAGCCTTCAGGGTCCAG  
GCAGCCACGAACTTGGCCTTATACAGGATTCCGG (配  
列番号112) ;

## Min4オリゴ

CTTTCCTGCCTAGCGATTTCTTTTCCTAGCGTGAAGC  
TGACCCCACTGTGCGTGACCCTGTATATGGATGAC (配  
列番号113) ;

## Min5オリゴ

CGTACCTGGACAGTCCCAGCTTCTCGAAGTTGATG  
ATGCTGGCTCCCAGCACACGTCATCCATATACAG (配  
列番号114) ;

## Min6オリゴ

GGACTGTCCAGATACGTGGCTAGGCTGATCCTGAAG  
GAGCCTGTGCACGGCGTGTCCACCCTGCCAGAGAC (

配列番号115) ;

Min7オリゴ

GCTCAGCCACTTCCACACAGGCACTCCATAGTACAC  
GGTCCTCCTCACCACGGTGGTCTCTGGCAGGGTG (配  
列番号116) ;

Min8オリゴ

GTGGAAGTGGCTGAGCCTGCTGGTGCCCTTTGTGGG  
TACCTGATCTAGAGC (配列番号117)。

# 【0163】

さらなるプライマーは、隣接プライマー5'、GCG CAA GAA GC  
T TGC TAG CG (配列番号118) および隣接プライマー3'、GC  
T CTA GAT CAG GTA CCC CAC (配列番号119) であ  
った。

# 【0164】

もとのpMIN. 0ミニ遺伝子構築を、平均約70ヌクレオチド長の8つの重  
複するオリゴ (Operon Technologies Inc.によって合成  
され、そしてHPLC精製された) を用いて行った。各オリゴは、15ヌクレオ  
チドだけその隣接のものと重複し、そして最後のマルチエピトープミニ遺伝子を  
、PCRを用いた3セットの反応において重複するオリゴを伸長することによっ  
てアセンブルした (Hori, Gene 77:51-59 (1989))。

# 【0165】

最初のPCR反応について、5  $\mu$ gの各2つのオリゴをアニールさせ、そして  
伸長した。1+2、3+4、5+6および7+8を、Pfuポリメラーゼ緩衝液  
(10mM KCl、10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、20mM Tris-Cl、  
pH8.75、2mM MgSO<sub>4</sub>、0.1% TRITON X-100およ  
び100mg/ml BSAを含む) 中に0.25mMの各dNTPおよび2.  
5単位のPfuポリメラーゼを含む100  $\mu$ lの反応物中で合わせた。Perk  
in/Elmer 9600 PCR機械を使用した。そして使用したアニール  
温度は、各プライマー対の計算された最低のTmよりも5℃低かった。全長ダイ

マー産物をゲル精製し、そして1-2および3-4の産物、ならびに5-6および7-8の産物を含む2つの反応物を混合し、10サイクルアニールし、そして伸長した。次いで、2つの反応物の半分を混合し、そしてアニールおよび伸長を5サイクル行い、その後、隣接プライマーを添加して、さらに25サイクルの間全長産物を増幅した。この全長産物をゲル精製し、そしてpCR-blunt (Invitrogen) 中にクローニングし、そして個々のクローンを配列決定することによってスクリーニングした。このMinインサートをNheI-KpnIフラグメントとして単離し、そして発現のためにpcDNA3.1(-)/Myc-HisA (Invitrogen) の同じ部位中にクローニングした。このMinタンパク質は、MycおよびHisの抗体エピトープタグをそのカルボキシ末端に含む。

#### 【0166】

すべての記載されるPCR反応について、合計30サイクルを、Pfuポリメラーゼおよび以下の条件を用いて行った：95℃で15秒間、アニール温度で30秒間、72℃で1分間。使用したアニール温度は各プライマー対の計算されるT<sub>m</sub>よりも5℃低かった。

#### 【0167】

pMIN.0に対する3つの変化を施して、pMIN.1 (図21；配列番号37、pMIN-AOSともいう) を産生した。このマウスovaエピトープを除去し、HBV pol 551-560の9位のアラニンアンカー残基 (#547) を、バリンへと変換した。これは、インビトロ結合アフィニティーを40倍増加させ、そして翻訳終止コドン、マルチエピトープコード配列の末端に導入した。2つの重複するフラグメントを増幅し、そしてそのフラグメントを合わせることによってこの変化を行って、全長産物を得た。

#### 【0168】

第一の反応は、5' pcDNAベクタープライマーT7およびプライマーMin-ovaR (ヌクレオチド247-218) TGGACAGTCCCACTCCAGCACCAACGTCA (配列番号120) を使用した。この3' の半分を、以下のプライマーを使用して増幅した：Min-ovaF (ヌクレオチド

228-257) GCTGGGAGTGGGACTGTCCAGGTACGTG  
GC (配列番号121) およびMin-StopR (ヌクレオチド390-36  
1) GGTACCTCACACAAAGGGCACCAGCAGGC (配列番号  
122)。

# 【0169】

この2つのフラグメントを、ゲル精製し、混合し、変性し、アニールし、そしてPCRの5つのサイクルを用いて充填した。この全長フラグメントを、隣接プライマーT7およびMin-Stopを用いてさらに25サイクル増幅した。この産物を、ゲル精製し、NheIおよびKpnIを用いて消化し、そして配列決定および発現のためにpcDNA3.1中にクローニングした。pMin.1からのインサートを、NheI-KpnIフラグメントとして単離し、そしてpEP2中にクローニングしてpEP2-AOSを作製した。

# 【0170】

(実施例II：Tヘルパー細胞活性化についてのアッセイ)

本実施例は、Tヘルパー細胞活性をアッセイするための方法を示す。Tヘルパー細胞活性をアッセイするための1つの方法は、免疫された生物の脾細胞を使用する。手短には、脾細胞ペレットを、0.001M Tris-HCl、pH 7.5中に8.3g/Lの塩化アンモニウムを含む2~3mlの赤血球細胞溶解緩衝液を用いて懸濁する。この細胞を、室温にて時折ボルテクスしながら3~5分間溶解緩衝液中にてインキュベートする。過剰容量の50mlのR10培地をこの細胞に添加し、そしてその細胞をペレット化する。この細胞を再懸濁し、そして1回または2回R2培地またはR10培地中でペレット化する。

# 【0171】

この細胞ペレットを、R10培地中に懸濁し、そして計数する。この細胞懸濁物が凝集する場合、この凝集物を、濾過によってかもしくはその凝集物を重力によって沈降させることによって除去した。この細胞の濃度を $10^7/\text{ml}$ とし、そして100 $\mu\text{l}$ の脾細胞を96ウェルの平底プレートに添加する。

# 【0172】

適切なペプチド (例えば、汎DRエпитープ (配列番号145)) の希釈物を

、R10培地中に、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ および $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$ で調製し、そして $100\mu\text{l}$ のペプチドを、脾細胞の二連または三連のウェルに加える。最終ペプチド濃度は、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.05\mu\text{g}/\text{ml}$ および $0.005\mu\text{g}/\text{ml}$ である。コントロールウェルには、 $100\mu\text{l}$ のR10培地を与える。

#### 【0173】

このプレートを、3日間 $37^{\circ}\text{C}$ でインキュベートする。3日後、 $20\mu\text{l}$ の $50\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の $^3\text{H}$ -チミジンを1ウェルあたりに加える。細胞を、 $18\sim 24$ 時間インキュベートし、次いで、ガラスファイバーフィルター上に採取する。増殖している細胞のDNAへの $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みを、 $\beta$ カウンターにおいて測定する。

#### 【0174】

Tヘルパー細胞活性についての第二のアッセイは、Alexanderら、前出およびSette (WO 95/07, 707) に記載されるように、Mancaraら、J. Immunol. 146:1964-1971 (1991) から適応されるように (これは、本明細書において参考として援用される)、インビトロで刺激される末梢血単核細胞 (PBMC) を使用する。手短には、PBMCを健康なドナーから収集し、そしてFicoll-Plaque (Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ) を用いて精製する。PBMCを、24ウェルの組織培養プレートにて、 $4\times 10^6$ 細胞/ $\text{ml}$ でプレートする。ペプチドを、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度にて添加する。培養物を、5%の $\text{CO}_2$ 中で $37^{\circ}\text{C}$ でインキュベートする。

#### 【0175】

第4日目に、組換えインターロイキン-2 (IL-2) を、最終濃度 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加する。培養物に、 $1\text{ml}$ の培地を吸引し、そしてIL-2を含む新鮮な培地に置き換えることによって3日おきに給餌する。抗原を用いたT細胞の2回のさらなる刺激をおよそ14日目および28日目に行う。このT細胞 ( $3\times 10^3$ /ウェル) を、ペプチド ( $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を用い、自己PBMC細胞

( $2 \times 10^6$  の照射した細胞/ウェル) (7500ラドで照射した) を抗原提示細胞として使用して、24ウェル組織培養プレートの合計3つのウェルにおいて、刺激した。さらに、14日目および28日目にて、T細胞増殖応答を、以下の条件下で決定する： $2 \times 10^4$  T細胞/ウェル；抗原提示細胞として $1 \times 10^5$  の照射したPBMC/ウェル； $0.01 \mu\text{g/ml} \sim 10 \mu\text{g/ml}$  の最終濃度で変動するペプチド濃度。T細胞の増殖を、 $^3\text{H}$ チミジン ( $1 \mu\text{Ci}$ /ウェル) の添加によって3日後に、その細胞の採集前18時間にて測定した。細胞を、ガラスフィルター上にて採取し、そして $^3\text{H}$ -チミジン取り込みを、 $\beta$ プレートカウンターにおいて測定した。これらの結果は、 $^3\text{H}$ -チミジン取り込みを測定することによるTヘルパー細胞活性をアッセイするための方法を実証する。

### 【0176】

(実施例III：細胞傷害性Tリンパ球応答についてのアッセイ)

本実施例は、細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) 活性をアッセイするための方法を示す。CTL応答を、本質的に以前に記載されるように測定する (Vitellioら、Eur. J. Immunol. 27:671-678 (1997)、これは、本明細書において参考として援用される)。手短には、DNA免疫の約10-35日後に、動物から脾細胞を単離し、そして37℃で同系の照射した ( $3000$ ラド) ペプチドコーティングしたLPS芽細胞 ( $1 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$  細胞/ml) と、T25フラスコ中の10mlのR10中で同時培養した。LPS芽細胞を、37℃で3日間T75フラスコ中の30mlのR10培地中の $25 \mu\text{g/ml}$  のリボポリサッカライド (LPS) (Sigma cat. no. L-2387; St. Louis, MO) および $7 \mu\text{g/ml}$  のデキストラン硫酸 (Pharmacia Biotech) を用いて脾細胞 ( $1 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$  細胞/ml) を活性化することによって得る。次いで、リンパ球を、 $2.5 \times 10^7 \sim 3.0 \times 10^7$  /ml の濃度で再懸濁し、照射し ( $3000$ ラド)、そして適切なペプチド ( $100 \text{ pg/ml}$ ) を用いて37℃で1時間コーティングする。細胞を、一回洗浄し、所望の濃度にてR10培地中に再懸濁し、そしてレスポンダー細胞調製物に添加する。培養物を、 $^{51}\text{Cr}$  放出アッセイにおいて7日目に細胞変性活性についてアッセイする。



## 【0177】

$^{51}\text{Cr}$  放出アッセイについて、標的細胞を、90分間37℃にて150  $\mu\text{l}$  のナトリウム $^{51}\text{Cr}$  クロメート ( $^{51}\text{Cr}$ ) (New England Nuclear; Wilmington DE) を用いて標識し、3回洗浄し、そして適切な濃度でR10培地中に再懸濁する。アッセイについて、 $10^4$  の標的細胞を、そのペプチドの10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の存在下または非存在下でU底96ウェルプレート中の最終容量200  $\mu\text{l}$  中の異なる濃度のエフェクター細胞の存在下でインキュベートする。上清を37℃6時間後に除去し、そして特異的な溶解のパーセントを、以下の公式によって決定する：特異的な溶解のパーセント =  $100 \times (\text{実験上の放出} - \text{自然放出}) \cdot (\text{最大放出} - \text{自然放出})$ 。異なる実験からの応答の比較を容易にするために、パーセント放出データを、 $10^6$  細胞あたり溶解ユニット30に変形する ( $\text{LU}30/10^6$ )。ここで、 $\text{LU}30$  は、6時間アッセイにおいて  $10^4$  標的細胞の30%溶解を誘発するために必要とされるエフェクター細胞の数と定義される。LU値は、(ペプチドの存在下で得られた  $\text{LU}30/10^6$ ) - (ペプチドの非存在下で得られた  $\text{LU}30/10^6$ ) で表される。これらの結果は、細胞からの  $^{51}\text{Cr}$  放出を測定することによってCTL活性をアッセイするための方法を実証する。

## 【0178】

(実施例IV：MHCクラスIIエピトープをコードする発現ベクターおよびMHCクラスII標的化配列を用いて免疫されるマウスにおけるT細胞増殖)

本実施例は、MHCクラスIIエピトープをコードする発現ベクターおよびMHCクラスII標的化配列がT細胞を活性化するに有効であることを実証する。

## 【0179】

T細胞増殖アッセイにおいて使用される構築物は、実施例Iに記載され、そしてCMV駆動発現ベクターであるベクターpEP2中にクローニングされた。インビトロでのT細胞刺激に使用されるペプチドは、以下である：Ova323-339、ISQAVHAHAHAINEAGR (配列番号123)；HBVcore128、TPPAYRPPNAPILF (配列番号124)；HBVenv182、FFLLTRILTI PQSLD (配列番号125)；およびPADR

E、AKFVAAWTLKAAA（配列番号38）。

# 【0180】

T細胞増殖を、本質的に実施例I Iに記載されるようにアッセイした。手短には、12～16週齢のB6D2 F1マウス（1構築物あたり2マウス）に、100 $\mu$ gの指定された発現ベクター（1脚あたり50 $\mu$ g）を、前脛骨筋中に注射した。11日後、脾臓をそのマウスから収集し、そしてDounce均質化によって単細胞懸濁物へと分離した。脾細胞を計数し、そして100万の脾細胞を、96ウェルプレート中の1ウェルあたりにプレートした。各サンプルを三連で行った。それぞれの発現ベクターによってコードされる10 $\mu$ g/mlの対応するペプチドを各ウェルに添加した。1ウェルは、ネガティブコントロールのために添加されたペプチドなしの脾細胞を含んだ。細胞を、3日間、37℃で5%CO<sub>2</sub>中に培養した。

# 【0181】

3日後、1 $\mu$ Ciの<sup>3</sup>H-チミジンを、各ウェルに添加した。37℃で18時間後、その細胞を、ガラスフィルター上にて採取し、そして<sup>3</sup>H取り込みを、LKB  $\beta$  プレートカウンターにて測定した。T細胞増殖アッセイの結果を表9に示す。抗原特異的T細胞増殖を、刺激指数（SI）として示す；これは、抗原の非存在下での<sup>3</sup>H-チミジン取り込みで除した、抗原の存在下での平均の<sup>3</sup>H-チミジン取り込みの比と定義する。

# 【0182】

免疫原「PADRE+IFA」は、不完全フロイントアジュバントにおけるそのPADREペプチドがそのマウスに注射され、そしてPADRE配列を含むMHCクラスIIエピトープ構築物を注射する場合に見られる応答と比較される場合のポジティブコントロールである。表9に示すように、試験した発現ベクターの殆どは、PADREペプチドの添加に応答してT細胞増殖を活性化するにおいて有効であった。発現ベクターのいくつかの活性は、不完全フロイントアジュバント中のPADREペプチドを用いた免疫において見られるものと同等であった。MHCクラスIおよびMHCクラスIIの両方のエピトープを含む発現ベクターであるpEP2-AOSおよびpcDNA-AOSもまた、PADREペプチド

ドの添加にตอบสนองしてT細胞増殖を活性化するにおいて有効であった。

### 【0183】

これらの結果は、MHCクラスII標的化配列に対して融合されたMHCクラスIIのエピトープをコードする発現ベクターがT細胞増殖を活性化するにおいて有効であり、そして免疫応答を刺激するために有用であることを示す。

### 【0184】

(実施例V：トランスジェニックマウスを使用するインビボアッセイ)

(A. 材料および方法)

ペプチドを、以前に記載された標準的なFmoc固相合成法(Ruppertら、Cell 74:929(1993); Setteら、Mol. Immunol. 31:813(1994))に従って、合成した。ペプチドの純度を、分析用逆相HPLCによって決定し、そして純度は、日常的に95%を超えた。Theradigm-HBVRiボペプチドワクチンの合成および精製は、(Vitielloら、J. Clin. Invest. 95:341(1995))に記載されている。

### 【0185】

(マウス)

本研究において使用するHLA-A2.1トランスジェニックマウスは、SJL/Jマウス(Jackson Laboratory、Bar Harbor、ME)を用いて、HLA-A2.1の $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ ドメイン、およびH-2K<sup>b</sup>の $\alpha 3$ ドメインからなるキメラ遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを交雑することに由来する、F1世代であった。本明細書において、以下、この系統をHLA-A2.1/K<sup>b</sup>-H-2<sup>b\*\*</sup>という。この親HLA-A2.1/K<sup>b</sup>トランスジェニック系統を、トランスジーンおよび(Vitielloら、J. Exp. Med. 173:1007(1991))に記載される方法を使用して、C57BL/6バックグラウンドにおいて生成した。本研究において使用するHLA-A11/K<sup>b</sup>トランスジェニックマウスは、(Alexanderら、J. Immunol. 159:4753(1997))に記載されるトランスジェニックマウスと同一であった。

## 【0186】

(細胞株、MHC精製およびペプチド結合アッセイ)

ペプチド特異的細胞傷害性アッセイのための標的細胞は、HLA-A2.1/ $K^b$ キメラ遺伝子を用いてトランスフェクトしたJurkat細胞(Vitieiraら、J. Exp. Med. 173:1007 (1991))、およびHLA-A11/ $K^b$ を用いてトランスフェクトした221腫瘍細胞(Alexanderら、J. Immunol. 159:4753 (1997))であった。

## 【0187】

内的にプロセスされたエピトープの提示を測定するために、Jurkat A2.1/ $K^b$ 細胞を、pMin.1またはpMin.2-GFPミニ遺伝子を用いてトランスフェクトし、次にエピトープ特異的CTL株に対する細胞傷害性アッセイにおいて試験した。トランスフェクションのために、Jurkat A2.1/ $K^b$ 細胞を $10^7$ 細胞/mlで再懸濁し、そして $30\mu\text{g}$ のDNAを $600\mu\text{l}$ の細胞懸濁液に添加した。細胞を、 $0.4\text{cm}$ キュベット中で、 $0.25\text{kV}$ 、 $960\mu\text{Fd}$ でエレクトロポレーションした後、細胞を氷上で10分間インキュベートし、次にRPMI培養培地中で2日間培養した。次に細胞を $200\text{U/ml}$ のハイグロマイシンB(Calbiochem, San Diego CA)を含有する培地中で培養し、安定なトランスフェクタントを選択した。FACSを使用して、グリーン蛍光タンパク質(GFP)発現細胞の画分を、15%~60%に富化した(データ示さず)。

## 【0188】

精製したHLA-A2.1および-A11分子に対するペプチドの結合を定量的に測定する方法は、Ruppertら、Cell 74:929 (1993); Setteら、Mol. Immunol. 31:813 (1994); Alexanderら、J. Immunol. 159:4753 (1997)に記載される。

## 【0189】

全ての腫瘍細胞株および初回刺激したマウス由来の脾臓CTLを、10% FBS、 $4\text{mM}$  L-グルタミン、 $5\times 10^{-3}\text{M}$  2-ME、 $0.5\text{mM}$  ビルビ

ン酸ナトリウム、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$  ストレプトマイシン、および $100\text{U}/\text{ml}$  ペニシリンを補充したHepes (Life Technologies、Grand Island、NY) を有するRPMI 1640培地からなる培養培地 (CM) 中で増殖させた。

#### 【0190】

(ミニ遺伝子マルチエピトープDNAプラスミドの構築)

pMIN. 0およびpMIN. 1 (すなわち、pMIN-AOS) を、上記のように、および米国特許出願第60/085, 751号に記載のように、構築した。

#### 【0191】

(pMin. 1-No PADREおよびpMin. 1-Anchor)

pMin. 1を2つの重複するフラグメントを使用して増幅し、次にこれを組み合わせて、全長産物を生じた。第1の反応は、5' p cDNAベクタープライマーT7、およびpMin. 1-No PADREについて

#### 【0192】

【化1】

ATCGCTAGGCAGGAAGTTATACAGGATTCC

#### 【0193】

(配列番号126) またはpMin. 1-Anchorについて

#### 【0194】

【化2】

TGGACAGTCCGGCTCCCAGCACACGT

#### 【0195】

(配列番号127) のいずれかを使用した。3' 半分を、プライマー

#### 【0196】

【化3】

TTCTGCGCTAGCGATTTC

【0197】

(配列番号128) (No PADRE) または

【0198】

【化4】

GCTGGGAGCCGGACTGTCCAGGTACGT

【0199】

(配列番号129) (Anchor)、およびMin-StopRを用いて増幅した。5' および3' 末端の増幅より生成される2つのフラグメントを、ゲル精製し、混合し、変性し、アニールし、そして5サイクルのPCRを用いて充填 (fill in) した。全長フラグメントを、隣接するプライマーT7およびプライマーMin-StopRを用いて25より多いサイクルで、さらに増幅した。

【0200】

(pMin. 1-No Sig.)

I gシグナル配列を、pMin. 1から、プライマー

【0201】

【化5】

GCTAGCGCCGCCACCATGCACACCCTGTGGAAGCCGGAATC

【0202】

(配列番号130)、およびpcDNArev (Invitrogen) プライマーを用いるPCR増幅によって欠失した。この産物をPCR-blunt中にクローニングして、配列決定した。

【0203】

(pMin. 1-Switch)

3つの重複するフラグメントを、pMin. 1より増幅し、組み合わせ、そし

て伸長した。5' フラグメントをベクタープライマー T7、およびプライマー

【0204】

【化6】

GGGCACCAGCAGGCTCAGCCACACTCCCAGCACCACGTC

【0205】

(配列番号131)を用いて、増幅した。第2の重複するフラグメントを、プライマー

【0206】

【化7】

AGCCTGCTGGTGCCCTTTGTGATCCTGAAGGAGCCTGTGC

【0207】

(配列番号132)、およびプライマー

【0208】

【化8】

AGCCACGTACCTGGACAGTCCCTTCCACACAGGCACTCCAT

【0209】

(配列番号133)を用いて増幅した。プライマー

【0210】

【化9】

TGTCCAGGTACGTGGCTAGGCTGTGAGGTACC

【0211】

(配列番号134) およびベクタープライマー p cDNA rev (Invitrogen) を使用して、第3の(3') フラグメントを増幅した。フラグメント1、2、および3を増幅して、ゲル精製した。フラグメント2および3を混合し、アニールし、増幅し、そしてゲル精製した。フラグメント1を産物2および3

と組み合わせ、そして伸長し、ゲル精製し、そしてp c DNA 3. 1中に発現のためにクローニングした。

# 【0212】

(pMin. 2-GFP)

シグナル配列を、pMin. 0から、Min. 0-No Sig-5' および p c DNA rev (Invitrogen) プライマー

# 【0213】

【化10】

GCTAGCGCCGCCACCATGCACACCCTGTGGAAGGCCGAATC

# 【0214】

(配列番号135)を用いるPCR増幅によって欠失した。この産物をpCR-blunt中にクローニングして、配列決定した。シグナル配列を欠失するマルチエピトープ構築物のオープンリーディングフレームを含有する挿入物を、NheIおよびHindIIIを用いて切り出し、pEGFPN1 (Clontech)の同一の部位中へ連結した。この構築物は、シグナル欠失pMin. 0構築物のコード領域を、グリーン蛍光タンパク質 (GFP) のN末端に融合する。

# 【0215】

(マウスの免疫)

DNA免疫のために、マウスを、50  $\mu$  lの10  $\mu$  M カルジオトキシン (cardiotoxin) (Sigma Chem. Co.、第C9759番)を、前脛骨筋中に、両側に注射することにより、前処理した。4～5日後、PBSで希釈した100  $\mu$  gのDNAを、同一の筋肉中に注射した。

# 【0216】

-20℃で保存したTheradigm-HBVリボペプチド (DMSO中に10 mg/ml)を、45℃で10分間解凍し、次に室温のPBSで1:10 (容量/容量)で希釈した。PBSの添加直後、リボペプチド懸濁液を強くボルテックスし、そして100  $\mu$  lを尾の底部に皮下注射した (100  $\mu$  g/マウス)。

。



## 【0217】

個々のCTLエпитーブの免疫原性を、I-A<sup>b</sup>拘束Th細胞を誘導するように作用する、HBVコア128～140ペプチド(TPPAYRPPNAPIL(配列番号124)、140 $\mu$ g/マウス)とともに各CTLエпитーブ(50 $\mu$ g/マウス)を混合することにより、試験した。次に、ペプチドカクテルを、不完全フロイントアジュバント(Sigma Chem. Co.)中でエマルジョン化し、そして100 $\mu$ lのペプチドエマルジョンを尾の底部に皮下注射した。

## 【0218】

(インビトロCTL培養および細胞傷害性アッセイ)

免疫の11～14日後、動物を屠殺し、そして脾細胞の単一細胞懸濁液を調製した。cDNAで初回刺激した動物由来の脾細胞を、インビトロで、ミニ遺伝子中で示される各ペプチドエпитーブを用いて刺激した。脾細胞(2.5～3.0 $\times 10^7$ /フラスコ)を、10 $\mu$ g/mlのペプチド、ならびにLPS(25 $\mu$ g/ml)および硫酸デキストラン(7 $\mu$ g/ml)で3日間活性化された、10<sup>7</sup>の照射された脾臓細胞の存在下で、直立した25cm<sup>2</sup>フラスコ中で培養した。3連の培養物を、各エпитーブで刺激した。5日後、培養物に、新鮮なCMを供給した。インビトロ培養の10日後、各フラスコからの2～4 $\times 10^6$ CTLを、100 $\mu$ g/mlのペプチドで60～75分間37℃で処理し、次に3500ラドで照射した、10<sup>7</sup>LPS/硫酸デキストランで活性化した脾細胞で再刺激した。CTLを、8mlのサイトカインを含まないCM中の6mlウェルプレート中で、再刺激した。18時間後、培養物に、conA活性化脾細胞の上清中に含まれるサイトカインを添加し(10～15%最終濃度、容量/容量)、そして3日目に、10～15%サイトカイン上清を含有するCMを添加したか、または10～15%サイトカイン上清を含有するCMにおいて増殖させた。再刺激の5日後、各培養物のCTL活性を、ペプチドの存在下および非存在下において、10<sup>4</sup><sup>51</sup>Cr標識された標的細胞とともに異なる数のCTLをインキュベートすることによって、測定した。NK細胞からの非特異的な細胞傷害性を減少させるために、YAC-1細胞(ATCC)もまた、20:1の比のYAC-1:<sup>51</sup>C

r 標識された標的細胞に添加した。HBV P o 1 5 5 1 エピトープに対する C T L 活性を、DNA で初回刺激された脾細胞をネイティブの A 含有ペプチドでインビトロ刺激し、そして同一のペプチドに対する細胞傷害性活性について試験することにより、測定した。

#### 【0219】

応答をより容易に比較するために、標準 E : T 比に対する % 細胞傷害性データカーブを、1 L U を 1 0 0 : 1 の E : T 比で 3 0 % の標的細胞の溶解を達成するのに必要とされる溶解活性として定義し、 $10^6$  エフェクター細胞あたりの L U に変換した。比 C T L 活性 ( $\Delta$  L U) を、ペプチドを用いて得られた L U 値から、ペプチドの非存在下で得られた L U 値を減算することによって、計算した。以下の判定基準の全てが満たされる場合、所与の培養物を、C T L 誘導について陽性であるとしてスコアした：1)  $\Delta$  L U > 2；2) L U ( + ペプチド )  $\div$  L U ( - ペプチド ) > 3；および 3) 2 つの最高の E : T 比において、ペプチドの有無において試験した % 細胞傷害性における 1 0 % を超える差異（開始 E : T 比は、慣用的に 2 5 ~ 5 0 : 1 であった）。

#### 【0220】

7 日間の刺激期間の間に必要な場合、C T L が サイトカイン含有 CM において増殖されたことを除いて、上記のように、6 ウェル培養条件を使用して、ペプチド処理 L P S / D x S 活性化脾細胞を用いる毎週の反復する C T L 刺激を介して、C T L 株を、p M i n . 1 で初回刺激された脾細胞から生成した。

#### 【0221】

( サイトカインアッセイ )

ミニ遺伝子でトランスフェクトされた標的細胞に応答する I F N -  $\gamma$  産生を測定するために、 $4 \times 10^4$  C T L を、9 6 ウェルの平底プレート中で、等価数のミニ遺伝子でトランスフェクトされた J u r k a t A 2 . 1 K<sup>b</sup> 細胞とともに、培養した。3 7 での一晩のインキュベーションの後、各ウェルからの培養上清を収集し、そしてサンドイッチ E L I S A を用いて I F N -  $\gamma$  濃度についてアッセイした。Immulon I I マイクロタイターウェル ( D y n a t e c h , B o s t o n , M A ) を 0 . 2  $\mu$  g の抗マウス I F N -  $\gamma$  捕獲 A b である R 4

－6A2 (Pharmingen) を用いて、4℃で一晩コートした。ウェルをPBS/0.1% Tween-20で洗浄し、そして1% BSAでブロッキングした後、Ab-コートしたウェルを、室温で2時間、培養上清サンプルとともにインキュベートした。2次抗IFN- $\gamma$  AbであるXMG1.2 (Pharmingen) を、ウェルに添加し、そして室温で2時間インキュベートさせた。次にウェルをアビジン-DHとともにインキュベーションし、最後にビオチン化西洋わさびペルオキシダーゼH (Vectastain ABCキット、Vector Labs、Burlingame、CA) およびTMBペルオキシダーゼ基質 (Kirkegaard and Perry Labs、Gaithersburg、MD) と共にインキュベーションして、発色させた。各サンプル中に存在するサイトカインの量を、rIFN- $\gamma$  標準 (Pharmingen) を使用して計算した。

### 【0222】

#### (b. 結果)

#### (エピトープの選択およびミニ遺伝子構築物の設計)

最初の一連の実験において、平衡化した多重特異性のCTL応答が、いくつかの優性のHLAクラスI-拘束エピトープをコードする単純なミニ遺伝子cDNA構築物によって誘導され得るか否かが、問題であった。従って、ヒトにおけるHBVおよびHIV感染の間のCTL免疫におけるその関連性、ウイルスサブタイプにおけるその配列保存性、およびそのクラスI-MHC結合親和性(表10)に基づいて、9つのCTLエピトープを選択した。これらの9つのエピトープのうち、6つは、HLA-A2.1によって拘束され、そして3つは、HLA-A11-拘束を示した。1つのエピトープHBV Pol551を、2つの異なる形態において研究した：野生型配列またはより高度の結合親和性のために操作されたアナログ(HBV Pol551-V)のいずれか。

### 【0223】

表10において参照されるように、いくつかの独立した研究室が、これらのエピトープが、HBVまたはHIV感染の間の、優性CTL応答の一部であることを報告した。このエピトープの全てが、異なるHBVサブタイプおよびHIVク

リード中の一次アミノ酸配列において、75%を超える保存性を示した。ペプチドのMHC結合親和性もまた、エпитオプの選択において考慮した。これらの実験は、広範囲の親和性を有するエпитオプを用いる免疫の可能性を扱い、そして表10に示すように、6つのHBVエпитオプおよび3つのHIV HLA-拘束エпитオプが、3 nM~200 nMの範囲のIC<sub>50</sub>%濃度を有して、2オーダーの範囲にわたるMHC結合親和性のスペクトルを網羅する。

#### 【0224】

トランスジェニックマウス中の6つのA2.1-拘束CTLエпитオプおよび3つのA11-拘束CTLエпитオプの免疫原性を、IFA処方物中のヘルパーT細胞ペプチドを用いる同時免疫によって、確認した。エпитオプの全ては、5~73ΔLU範囲において有意なCTL応答を誘導した(表10)。上記のように、HBV P01551のMHC結合および免疫原性を改善するために、このエпитオプのC末端A残基を、Vで置換し、HLA-A2.1に対する結合親和性の劇的な40倍の増加を生じた(表10)。親配列は、HLAトランスジェニックマウスにおいて、弱い免疫原性であるか、または非免疫原性であったが、HBV P01551-Vアナログは、IFA中で投与された場合、CTL活性の有意なレベルを誘導した(表10)。これらの結果に基づき、HBV P01551エпитオプのVアナログを、初期のミニ遺伝子構築物のために選択した。本明細書において報告される全ての実験において、CTL応答を、免疫においてVアナログを使用したか、またはネイティブエпитオプを使用したかにかかわらず、ネイティブHBV P01551エпитオプでコートした標的細胞を用いて測定した。

#### 【0225】

最後に以前の研究は、T細胞補助の誘導が、CTL応答の大きさおよび持続を有意に改善したことを示した(Vitielloら、J. Clin. Invest. 95:341(1995); Livingstonら、J. Immunol. 159:1383(1997))ので、ユニバーサルTh細胞エпитオプPADREもまた、ミニ遺伝子中に導入した。PADREは、広範のマウスおよびヒトMHCクラスIIハプロタイプに対して高いMHC結合親和性を有することが

以前に示されている (Alexanderら、Immunity 1:751 (1994))。特に、PADREが、本研究において使用するH-2<sup>b</sup>マウスにおいて、高度に免疫原性であることが、以前に示されている (Alexanderら、Immunity 1:751 (1994))。

#### 【0226】

9つのCTLエピトープおよびPADREをコードするプロトタイプのcDNAミニ遺伝子構築物であるpMin. 1を合成して、pcDNA3. 1ベクター中にサブクローニングした。ミニ遺伝子中の9つのエピトープの各々の位置は、結合部でのマウスH-2<sup>b</sup>およびHLA-A2. 1クラスI MHCエピトープを避けるように、最適化された。マウスIg  $\kappa$ シグナル配列もまた、構築物の5'末端に含め、他者 (Andersonら、J. Exp. Med. 174:489 (1991)) によって報告されたように、小胞体 (ER) 中でのCTLエピトープのプロセッシングを促進した。CTLエピトープのプロセッシングに影響し得る、翻訳されたポリペプチド遺伝子産物における、さらなるコンフォメーションな構造をさけるために、ATG終止コドン、pcDNA3. 1ベクター中のc-mycおよびポリhisエピトープのコード領域の上流の、ミニ遺伝子構築物の3'末端に、導入した。

#### 【0227】

(トランスジェニックマウスにおけるpMin. 1の免疫原性)

pMin. 1ミニ遺伝子構築物がインビボにおいてCTLを誘導する能力を評価するために、HLA-A2. 1/K<sup>b</sup>-H-2<sup>b</sup>\*<sup>+</sup>トランスジェニックマウスを、100  $\mu$ gの裸のcDNAを用いて、筋肉内に免疫した。cDNA免疫によるCTLの誘導のレベルを比較する手段として、動物のコントロール群もまた、Theradigm-HBV (破傷風毒素830~843 Th細胞エピトープと連結したHBVコア18 CTLエピトープからなるパルミトイル化 (palmitoylated) リポペプチド) で免疫した。

#### 【0228】

免疫した動物由来の脾細胞を、ミニ遺伝子中のコードされる各ペプチドエピトープを用いて、2回刺激し、次に、<sup>51</sup>Cr放出アッセイにおいて、ペプチド特異

的細胞傷害性活性についてアッセイした。図22に示す、pMin.1で初回刺激した脾細胞のCTL応答の代表的なパネルは、CTL誘導の有意なレベルがミニ遺伝子免疫によって生成されることを明確に示す。ことなるエピトープで刺激された培養物の大多数において、標的細胞の特異的溶解は、1:1でのE:Tの比において、50%を超えた。表11にまとめた、4つの独立した実験の結果は、pMin.1構築物が、HLA-A2.1/K<sup>b</sup>-H-2<sup>b</sup>\*トランスジェニックマウスにおいて、実際に高度に免疫原性であり、その6つのA2.1-拘束エピトープの各々に対して指向する広範なCTL応答を誘導することを示す。

### 【0229】

異なるエピトープにおいて、CTL誘導のレベルをより容易に比較するために、各脾細胞培養物についての%細胞傷害性の値を、ΔLUに変換し、そして各エピトープについての陽性培養物におけるCTL活性の平均ΔLUを測定した（実施例V、材料および方法、陽性判定基準について参照のこと）。この様式において表11に示されたデータは、pMin.1免疫によって誘発されるCTL誘導の大きさを確認する。なぜなら、50~700の間のΔLUの範囲の非常に高いCTL応答が、6つのA2.1-拘束エピトープに対して観察されたからである。より顕著なことに、6つのエピトープの内の5つについて観察された数百のΔLU応答は、その高度なCTL誘導効力について公知であるワクチン処方物である、Theradigm-HBVリポベプチドの応答に近づくか、またはこれを超える（Vitielloら、J. Clin. Invest. 95:341（1995）；Livingstonら、J. Immunol. 159:1383（1997））。HBV Env335エピトープは、リポベプチドと比較して、より低い平均ΔLU応答を示す唯一のエピトープであった（表11、44対349ΔLU）。

### 【0230】

（トランスフェクトした細胞によるミニ遺伝子エピトープのプロセッシング）

HBV Env335に対して観察された、減少したCTL応答は、ある程度予測されないものであった。なぜなら、このエピトープは、良好なA2.1結合親和性（IC50%、5nM）を有し、そしてまた、IFA中で投与された場合

に免疫原性であったからである。より低い応答は、少なくとも部分的に、インビボでのcDNA免疫後の、抗原提示細胞によるミニ遺伝子ポリペプチドからのこのエピトープの不十分なプロセッシングに起因し得る。この問題に対処するために、Jurkat A2.1K<sup>b</sup>腫瘍細胞を、pMin.1 cDNAでトランスフェクトし、そしてトランスフェクトした細胞によるHBV Env335エピトープの提示を、特異的なCTL株を使用してより免疫原性のA2.1-拘束エピトープと比較した。エピトープの提示もまた、コントロールcDNA構築物であるpMin.2-GFP（トランスフェクトした細胞中のミニ遺伝子発現を、FACSによって検出することを可能にするGFPと融合された、類似のマルチエピトープミニ遺伝子をコードする）でトランスフェクトした腫瘍細胞を使用して研究した。

### 【0231】

トランスフェクトされたJurkat細胞のエピトープ提示を、特定のCTL株（これは、読み出し（read-out）として役に立つ細胞傷害性またはIFN- $\gamma$ 産生を有する）を用いて分析した。CTL応答のレベルは、エピトープのインビボでの免疫原性と直接関連することが、見出された。インビボでの高い免疫原性エピトープ（例えば、HBV Core18、HIV Pol476、およびHBV Pol455）は、IFN- $\gamma$ 産生（図23A、各エピトープについて、 $>100\text{ pg/ml}$ ）または細胞傷害性活性（図23C、 $>30\%$ 特異的溶解）により測定されるように、pMin.1-GFPトランスフェクト細胞またはpMin.2-GFPトランスフェクト細胞によりCTL株に効率的に提示された。これらのインビボでの高い活性とは対照的に、HBV Env335特異的CTL株の、両方のトランスフェクトされた細胞の集団に対する刺激は、 $12\text{ pg/ml}$ 未満のIFN- $\gamma$ および $3\%$ 未満の特異的溶解を生じた。HBV Env335特異的CTL株は、天然に処理されたエピトープを効率的に認識しなかったが、この株は、他のエピトープに対して特異的なCTL株と比較して、ペプチドロードした標的細胞に対して、同等の応答を示した（図23B、D）。まとめると、これらの結果は、プロセッシングおよび/または提示の欠損が、インビボでの免疫原性の減退に起因し得るHBV Env335エピトープと関連

することを示唆する。

### 【0232】

(ミニ遺伝子免疫原性に対するヘルパーT細胞エピトープPADREの効果)

複数のHLA-A2.1拘束エピトープをコードするミニ遺伝子cDNAで免疫されたトランスジェニックマウスにおける広範にかつ平衡したCTL応答が得られたために、原型構築物の免疫原性に影響を与え得る、次の可能な変数を調べた。この型の分析は、さらなる(future)構築物の合理的かつ迅速な最適化をもたらした。さらに詳細には、ミニ遺伝子の免疫原性においてT細胞補助の分布を試験するためにPADREエピトープを欠失した、pMin.1原型に基づくcDNA構築物を合成した。

### 【0233】

免疫原性分析の結果は、PADRE Th細胞エピトープの欠失が、原型pMin.1構築物で免疫された動物における90~100%の頻度と比較して、これらのエピトープに対して観察された17~50%のCTL陽性培養物が示すように、4つのミニ遺伝子エピトープ(HBV Core18、HIV Env120、HBV Pol455、およびHBV Env335)に対する特異的CTL前駆体の頻度の有意な減少を生じることを示した(図25)。さらに、それらのエピトープのうち2つ(HBV Core18およびHIV Env120)について、pMin.1-No PADREによって誘導された陽性培養物における応答の規模は、pMin.1構築物の応答規模の20分の1~30分の1未満であった(図25A)。

### 【0234】

(エピトープ免疫原性に対するMHC結合親和性の調節の効果)

次に、エピトープ免疫原性に対するMHC結合の減少効果を定める(address)ために、HBV Pol551におけるVアンカー残基をネイティブな残基であるアラニンと置換した、構築物を合成した(図24B)。

### 【0235】

Th細胞エピトープの欠失とは異なり、アンカー残基の修飾による、HBV Pol551エピトープのMHC結合能力の40倍の減少は、エピトープ免疫原



性に影響を及ぼすようではなかった（図25B）。CTL陽性培養物のLUまたは頻度のいずれかにより測定される、HBV Pol 551 エピトープおよび他のエピトープに対するCTL応答は、MHC結合アンカー部位にネイティブAまたは改良されたV残基を含む構築物間で非常に類似していた。この知見は、最小のエピトープミニ遺伝子は、非常に異なるMHC結合親和性のエピトープを効率的に送達し得る概念を強化する。さらに、この知見は、異なる送達方法を介したエピトープ免疫原性の増強に、野生型HBV Pol 551 エピトープは、強力でないIFAエマルジョン中で送達された場合、本質的に非免疫原性であったという事実の観点から、特に関連する。

### 【0236】

（シグナル配列のミニ遺伝子構築物の免疫原性に対する効果）

シグナル配列を、pMin. 1 構築物から欠失させ、このことによってERにおけるミニ遺伝子ポリペプチドのプロセッシングを妨害した（図24C）。pMin. 1-No Sig 構築物の免疫原性を試験した場合、応答の全体的な減少が、4つのCTLエピトープに対して見出された。これらのエピトープのうちの2つ（HIV Env 120およびHBV Env 335）は、pMin. 1と比較してCTL陽性培養物の頻度の減少を示したが、残りのエピトープ（HBV Pol 455およびHIV Pol 476）は、それぞれ、平均CTL応答の大きさにおいて16倍減少（424から27ΔLUまで）および3倍減少（709から236ΔLUまで）を示した（図25C）。これらの知見は、pMin. 1プロトタイプ構築物においてコードされたいくつかのエピトープのERプロセッシングを可能にすることが、エピトープの同じパネルの細胞質プロセッシングのみを可能にする構築物と比較して、免疫原性を改善し得ることを示唆する。

### 【0237】

（エピトープ再配置の効果および新たな接合エピトープの作製）

試験した最終構築物において、HBV Env 335 エピトープの免疫原性を分析して、このエピトープがミニ遺伝子構築物の3'末端でのその位置により影響が及ぼされるか否かを決定した（図24D）。例えば、cDNA構築物のEnv エピトープの部分は、ミニ遺伝子の中央に位置した、より免疫原性のエピト

ープであるHBV Pol 455と切り換えられる。この改変はまた、2つの潜在的に新たなエピトープを作製したことに注意すべきである。図25Dに示されるように、この2つのエピトープの転移は、転移したエピトープのみならず、より全体的に他のエピトープの免疫原性に影響を及ぼすようである。エピトープの切り換えによって、HBV Env 335 に対するCTL誘導の消失を生じた(6つから検出された陽性培養物はなかった)。末端HBV Pol 455 エピトープにより誘導されたCTL応答はまた、減少したが、わずかであった(78に対して424の平均 $\Delta$ LU)。切り換えられたエピトープに加えて、pMin. 1-Switch構築物における他のエピトープに対するCTL誘導はまた、プロトタイプ構築物と比較して顕著に減少した。例えば、CTL応答はHIV Env 120 エピトープに対しては観察されず、そしてHBV Core 18 エピトープ(6つの陽性培養物のうち4つ、306から52まで平均 $\Delta$ LUが減少)およびHBV Pol 476 エピトープ(709から20まで平均 $\Delta$ LUが減少)に対して、有意に減少した(図25D)。

#### 【0238】

前述のように、2つのエピトープを切り換えることにより、新たな接合エピトープが作製されたことに注意すべきである。事実、pMin. 1-Switch 構築物において、2つの新たな潜在的CTLエピトープが、HBV Env 335-HIV Pol 476 エピトープ(LLVPFVIL (配列番号135))、H-2K<sup>b</sup>拘束されている)およびHBV Env 335-HBV Pol 551 エピトープ(VLGWVLSLV (配列番号136))、HLA-A2.1拘束されている)の配列から作製された。これらの接合エピトープは、これらが実際に免疫原性であるか否かを決定するために試験されていないが、このことは、HBV Env 335 エピトープおよびHIV Pol 476 エピトープの低い免疫原性を説明し得る。これらの知見は、接合エピトープを避けることが、HLAトランスジェニックマウスのようなインビボでの生物学的アッセイ系においてそれらの免疫原性を確認する能力であるために、マルチエピトープミニ遺伝子設計することにおいて重要であることを示唆する。

#### 【0239】

(pMin. 1においてコードされたA11エпитープに対するCTLの誘導)

複数のエпитープに対するのみならず、異なるHLA対立遺伝子により拘束されるエпитープに対しても広範なCTL応答を誘導するためのミニ遺伝子ワクチンアプローチの柔軟性をさらに試験するため、pMin. 1構築物における3つのA11エпитープがCTLについて免疫原性であるか否かを決定するために、同じ構築物におけるA2. 1拘束エпитープについての場合と同様に、HLA-A11/K<sup>b</sup>トランスジェニックマウスを免疫した。表12にまとめられるように、有意なCTL誘導は、全3つのHLA-A11拘束されたエпитープおよび3つのエпитープについて誘導されたCTL免疫のレベル(40~260ΔLUの範囲において)(これは、IFAにおいて送達されたペプチドのレベルを超える)に対して大部分の培養物で観察された(表10)。従って、種々のHLA拘束の9つのCTLエпитープは、インビボで全て有意なCTL誘導を実証したプロトタイプミニ遺伝子構築物に組み込まれ、このことによって、ミニ遺伝子DNAのプラスミドが、複数エпитープを送達し、HLA拘束およびMHC結合親和性を変化させる手段として免疫原性様式で免疫系に対して作用し得、そして適切なトランスジェニックマウス系統は、インビボでDNA構築物の免疫原性を測定するために使用されることが確認される。

#### 【0240】

CTLはまた、A11/K<sup>b</sup>トランスジェニックマウスの3つのA11エпитープに対して誘導された。これらの応答は、広範な集団適用範囲を付与する、複数のCTLエпитープのミニ遺伝子送達がヒトにおいて可能であり得ること、および適切なハプロタイプのトランスジェニック動物がミニ遺伝子DNAのインビボでの免疫原性を最適化するに有用なツールであり得ることを示唆する。さらに、動物(例えば、ヒトMHC分子によって認識されるCTLおよびHLAのエピトープに対する交差反応性を有する、保存されたHLA分子を有するサル)を使用して、HTLおよびCTLのエピトープのヒト免疫原性を決定し得る(Bertoniら、J. Immunol. 161:4447-4455(1998))。

## 【0241】

この研究によって、ヒトHLA抗原によって拘束されたエピトープに対する応答を試験することによる、DNAワクチンのインビボでの免疫原性を定量するためにHLAトランスジェニックマウスを使用することの最初の記載が示される。インビボでの研究は、インビトロアッセイでは容易には評価されないワクチン開発に非常に重要な変数（例えば、投与経路、ワクチン処方物、組織の生体分布、ならびに1次および2次リンパ器官の関連性（*involvement*））を扱うために必要とされる。その簡便性および柔軟性のために、HLAトランスジェニックマウスは、少なくとも初期のワクチン開発研究のために、高等動物種（例えば、非ヒト霊長類）でのより煩わしく、かつ高価な研究と比較して、魅力的な代替物である。上記のインビトロ提示研究は、インビボでの免疫原性とインビトロでの提示との間に直接的な相関が観察される限りは、ヒトエピトープを含むDNA構築物をスクリーニングするためのHLAトランスジェニックマウスの使用をさらに支持する。最後に、強力なCTL応答が全6つのA2・1拘束されたウイルスエピトープに対して、そしてプロトタイプpMin・1構築物においてコードされた3つのA11拘束されたエピトープにおいて観察された。5つのA2・1拘束されたエピトープについては、CTL応答の大きさは、リポペプチド、Theradiigm-HBV（ヒトにおいて強力なCTL応答を誘導することが以前示された）で観察された大きさに近かった（Vitielloら、J. Clin. Invest. 95:341（1995）；Livingstonら、J. Immunol. 159:1383（1997））。

## 【0242】

## 【表1】

表1 HBV由来のHTLエピソード

エピソード	配列	供給源	配列番号
1298.06	KQAFISFTYKFLC	IIBV POL 461	
F107.03	LQSLTNLLSNLSWL	IIBV POL 412	
1280.06	AGFELLTRLTIPQS	IIBV ENV 180	
1280.09	GTSEVYVPSALNPAD	IIBV POL 774	
CJ-08	VSEGVWIRTPAYRTPNAPI	IIBV NUC 120	
27.0280	GVWIKTPPAYRTPNA	IIBV NIC 123	
1186.25	SGGVWIKTPPAYRTP	IIBV NIC 121	
27.0281	RHYLTLWKAGILYK	IIBV POL 145	
F107.04	PELLAQFTSAICSVY	IIBV POL 323	
1186.15	LVPFQVQFVGLSTV	IIBV ENV 239	
1280.15	LHLYSHPILOFRKI	IIBV POL 381	
1298.04	KQCRKLFPVNEPDW	IIBV POL 764	
1298.07	AANWLKGTSPNAP	IIBV POL 764	
857.02	PIHTALQKACGCEMLLA	IIBV COR E 50	
35.0100	LCGQVQVTPYGVGRI	IIBV POL 683	
35.0096	ESRLVYDFESQSGNI	IIBV POL 387	
35.0093	VQDLTVNEKRLKLI	IIBV POL 96	
1186.18	NLSWLSDVSAAFYH	IIBV POL 472	

【0243】

【表2】

表2 HBV由来のCTLエピトープ

スーパータイプ	ペプチド	配列	供給源	配列番号
A2	924.07	ELPDSYRSV	HBV env 18-27	
	1035.02	VLILMLPV	HBVad-ENV (S Ag 335-343)	
	772.02	FLTRILCI	HBV ENV aye 183	
	922.15	ALMPLVACI	HBV aye pol 642	
	1168.02	GLSRVAVRL	HBV POL 455	
	927.11	PLLSLQHLL	HBV pol 562	
A3	1147.16	HTLWKAGILYK	HBV POL 149	
	1083.01	STLPETVYVR	HBV core 141	
	1090.11	SAICSVVVR	HBV pol 531	
	1090.10	QAFISPTIK	HBV pol 665	
	1069.16	NVSDPTLIK	HBV pol 47	
	1069.20	LVVDPSQSR	HBV pol 388	
	1142.05	KVNPVCLIK	HBVad-POL 429	
	1069.13	TLSSVSLYK	HBVad-POL 450	
	1147.04	LPDSRSV	HBV ENV 313	
	988.05	TPARVQGVF	HBV env 19-27	
A2	1147.04	TPARVQGVF	HBV POL 354	
	1069.06	LLVPRVQGVF	HBV env 336-347	
	1147.13	FLAQFTSAI	HBV POL 513	
	1147.14	VLLDYQGLPV	HBV ENV 259	
	1132.01	LVPTVQGVF	HBV ENV 239	
	1069.05	LLAQFTSAI	HBV pol 504-512	
	927.42	NI-SWLSLDY	HBV pol 411	
	927.41	LLSSNI-SWL	HBV pol 992	
	927.46	KLHLYSHPT	HBV pol 426	
	1069.071	KLHLYSHPT	HBV pol 503	
A3	1147.07	GLLQNSQNA	HBV ENV 63	
	927.47	PLYSIHPL	HBV aye pol 1076	
	1069.13	PLYSIHPL	HBV env 377-385	
	1013.1402	VLAQGRHLL	HBV env 377-385	
	26.0539	LVVDPSQSR	HBVad-ENV 177	
	26.0535	GVWIRTPAYR	HBV pol 538-546	

表2 (続き) HBV由来のCTLエピートープ

スーパータイプ	ペプチド	配列	供給源	配列番号
A3	26.0153	SSGCHGLAR	HBV X 64	
	1.0093	KVYVGGCR	HBV adr "X" 1548	
	26.0149	CALBTSAR	HBV X 69	
	26.0021	VSEGVMIR	HBV X nuc fus 296	
	26.0145	TLEETVVRRR	HBV X nuc fus 318	
	20.0131	SVVREATHI	HBV POL 524	
	1.0219	PVLEKCHIK	HBV adh "X" 1550	
	26.0008	PTESPTYK	HBV pol 656	
	20.0130	AFESPTYK	HBV POL 655	
	1147.05	PHCLAFSYM	HBV POL 530	
B7	1147.08	YPMALPLYA	HBV POL 640	
	1147.06	LPVCAFSSA	HBV X 68	
	1147.02	HPAAMPILL	HBV POL 420	
	28.0570	YPMALPLYA	HBV POL 640	
	19.0144	YPMALPLYA	HBV POL 640	
	1145.08	PHCLAFSSY	HBV POL 541	
	190.02	AYRPNAH	HBV NUC 131	
	1.0319	DLIDTASALY	HBV adr CORE 419	
	13.0129	EYLVSRGWI	HBV NUC 117	
	20.0254	PAAPTQCCY	HBV POL 61	
その他	2.0660	GYPALMPLY	HBV ALL 1224	
	1069.04	ITLWKAGILY	HBV pol 149	
	1069.08	ILLICLIPIL	HBV env 26558	
	1.0166	KYGNFGLY	HBV POL 629	
	1069.23	ITTSASALL	HBV POL 745	
	1069.01	DLIDTASALY	HBV env 50	
	2.0039	LDYVSALY	HBV ALL 1000	
	2.181	LYSIPILGF	HBV POL 402	
	1039.01	MMWYWGPSLY	HBV 360	
	2.0176	MSTIDLEAY	HBV adr 1521	
	1069.03	PLDKGKPYV	HBV pol 124	
	1090.09	PTTGRTSLY	HBV pol 804	
	20.0138	PWTHKVRHF	HBV POL 51	
	20.0135	RWMCI RRFI	HBV ENV 236	
	20.0269	RWMCLRRFI	HBV ENV 236	
	20.0139	SPCOSPTSW	HBV POL 167	

表2 (続き) HBV由来のCTLエпитープ

スーパータイプ	ペプチド	配列	供給源	配列番号
その他	1069.02	SLOVSAAFY	HBV pol 427	
	20.0136	SWLSLVPH	HBV ENV 374	
	20.0211	SWKFAFRL	HBV POL 392	
	20.0217	SWKRLARL	HBV ENV 197	
	2.0173	SWQHRKILL	HBV POL 4	
	13.0073	WFIHSKTF	HBV NUC 102	
	1.0774	WLAGGMDIHY	HBV adw clone 416	
	1039.06	WMMWYWGHSLY	HBV env 359	
	924.14	FLPSDHPFSI	HBV 18-27 1a var.	
	1090.77	YMDDVVLGV	HBV pol 538-546 sub	
	941.01	FLPSDYFVS	HBV 18-27 1a var.	
	1083.02	STLPETYVVR	HBV core 141-151 1a var.	
	1145.05	FPFSSWAF	HBV ENV 313 1a var.	
	1145.11	ETHCLAFSL	HBV POL 441 1a var.	
	1145.24	ETHCLAFSL	HBV ENV 541 1a var.	
	1145.06	FPFSSWAF	HBV ENV 313 1a var.	
	1145.29	IPHMSWAF	HBV ENV 313 1a var.	
	1145.07	IPILSSWAF	HBV ENV 313 1a var.	
	1145.09	FPVCLAFSV	HBV POL 541 1a var.	
	1145.10	ETHCLAFAY	HBV POL 541 1a var.	

【0246】

【表3】



表3 HCV由来のHTLEピートープ

ペプチド	配列	供給源	配列番号
P98.03	AAVAAQGYKVLVLPNSVAATLGRGAY	ICV NS3 1242-1267	
P98.04	AAVAAQGYKVLVLPNSVAAT	ICV NS3 1242	
P98.05	GYKVLVLPNSVAATLGRGAY	ICV NS3 1248	
1283.21	GYKVLVLPNSVAAT	ICV NS3 1248	
1283.20	AGQYKVLVLPNSVAATLGRGAY	ICV NS3 1251	
	GEGALQVWNNELIAPASRGNIIVS	ICV NS3 1251	
F134.08	GEGALQVWNNELIAPASRGNIIVS	ICV NS4 1914-1935	
1283.04	SKGWRLLAFTATYAQ	ICV NS4 1914	
1283.16	SKGWRLLAFTATYAQ	ICV NS4 1921	
1283.55	GSSYGQYSPQQRVE	ICV NS3 1025	
F134.05	NFISGIQYLAGLSTLPNHPA	ICV NS3 2641	
1283.61	ASCLAKLGVPLKRVV	ICV NS4 1772	
1283.25	GRHLFCHSKKKCDE	ICV NS3 2939	
35.0107	TVDFSLDPTFTFTT	ICV NS3 1393	
35.0106	YVVATDAIMTGYTG	ICV 1466	
		ICV 1537	

【0247】

【表4】

表4 HCV由来のCTLエピトープ

スーパータイプ	ペプチド	配列	供給源	配列番号
A2	106.18	ELLADANV	HCV NS1/E2 738	
	107.15	ELPAGGVV	HCV NS4 1812	
	101.02	YLWVQATV	HCV NS3 1590	
	103.1062	ILNMYHPLV	HCV Core 132	
	106.22	RLVFPULGV	HCV NS5 2611	
	24.0075	VLVGOVLAA	HCV NS4 1666	
	24.0073	WANRLIAPA	HCV NS4 1920	
	1174.08	HMWNFSQI	HCV NS4 1769	
	1073.06	ILAGYGAGV	HCV NS4 1851	
	24.0071	ILFILLADA	HCV NS1/E2 726	
	1073.07	YLPFRGPML	HCV Core 35	
	1.0119	YLYRIHADV	HCV NS3 1136	
	1.0573	YLRISQPRV	HCV Core 11	
A3	107.16	QVAGALVKK	HCV NS4 1853	
	1.0120	LIFCHSKKK	HCV NS3 1391	
	1.0955	QLFTFSRRR	HCV E1 299	
	1073.11	RLGVRAIRK	HCV Core 43	
	1073.13	RMVVGQVEIR	HCV NS1/E2 635	
	24.0090	VAGALVAFK	HCV NS4 1864	
	F104.81	VGIYLLPNR	HCV NS5 3036	
	1145.12	LPQCSRSIF	HCV Core 168	
	29.0035	IPFYKAI	HCV 1378	
	1069.62	CTGSSDILY	HCV NS3 1128	
その他	24.0092	PWAKIMWNP	HCV NS4 1765	
	13.0019	LSAFSLISY	HCV NS3 1922	

表4 (続き) HCV由来のCTLエピトープ

スーパータイプ	ペプチド	配列	供給源	配列番号
A3	24,0085	LGFGAYMSK	HCV NS3 1267	
	1174.21	KVCEKMALY	HCV NS3 2621	
	1174.16	WMNSTGPTK	HCV NS1/2 357	
	1973.04	TLIRPTLLY	HCV NS3 1812	
b7	16,0012	PYLVAYQA	HCV NS3 143	
	15,0047	YICLVNTHL	HCV NS1/2 633	
	24,0093	EVGGGMLRY	HCV NS3 129	
	1071.01	LTGCRADMGV	HCV 176	
その他	1071.01	NIVDVQLY	HCV EI 700	
	1,0509	GLSARSLHSY	HCV NS3 191	
	1071.17	MYVGDLCGSVF	HCV EI 275	
	1071.18	MYVGGVEHRL	HCV NS1/2 633	
	13,075	QYLAGLSTL	HCV NS4 1718	
	1145.13	FPQGSYSIF	HCV Core 168	
	1145.25	LPGCMPSIF	HCV Core 168	
	1292.24	LPGCSFSL	HCV Core 169	
	1145.14	LPGCSFSL	HCV Core 168	
	1145.15	LPGCSFSTP	HCV Core 168	

【0249】

【表5】



表6 HIV由来のCTLエpiteトープ

スーパータイプ	ペプチド	配列	供給源	配列番号
A2	25.0148	MAEDRLPIV	HIV POL 70	
	1069.32	VLAEGMSQV	HIV BRE 307	
	1211.04	KLTPLCVTL	HIV ENV 134	
	25.0062	KLYGKLNVA	HIV1 N87 67	
	25.0039	LITGQVDFL	HIV1 NEF 62	
	941.031	MDNRPPIV	HIV1 pol 476-484	
	25.0055	MDNRPPIV	HIV1 GAG 34	
	25.0057	RILQDLLEI	HIV1 VPR 72	
	1.0944	AVFHINER	HIV POL 1434	
	1.1056	KIQNRVYYR	HIV POL 1474	
A3	1069.49	QNAVHINER	HIV pol 1432	
	966.0102	AIQSSMTK	HIV pol 337	
	1150.14	MAVFIHNR	HIV pol 969	
	940.03	QVLPIMTYK	HIV ENV 82	
	25.0175	TLLCASDAR	HIV1 ENV 81	
	1069.43	TVFVNVNRK	HIV env 49	
	25.0039	VTISGQALK	HIV1 POL 65	
	146.01	EVVRQVRL	HIV ref 84-92	
	25.0040	IPHYCAVA	HIV env 293	
	15.0071	IPSHMETV	HIV POL 171	
B7	20.0056	CFKVSFPI	HIV env 285	
	20.0107	IPVNFQSGVY	HIV pol 883	
	25.0151	GLINPHSH	HIV1 POL 96	
	25.0143	LITGWCFLV	HIV1 N87 62	
	25.0043	YTAFIRSI	HIV1 POL 83	
	25.0055	AIRILQQL	HIV1 VPR 76	
	25.0049	ALVEICTEM	HIV1 POL 22	
	25.0032	LIQLTVNGI	HIV1 POL 100	
	25.0050	LVGPTVNI	HIV1 POL 65	
	25.0047	KAVKQVDFI	HIV1 POL 96	
A2	25.0162	KMIGGIGRH	HIV1 POL 78	
	25.0058	RAMASDRL	HIV1 ENV 814	
	1211.08	SLLNATDIIV		

表6 (続き) HIV由来のCTLエピトープ

スーパータイプ	ペプチド	配列	供給源	配列番号
A2	25.0041	TLNPFSP	IIIV POL 56	
A3	1.0046	IIVGKTPK	IIIV POL 1035	
	25.0064	MYIQASPR	IIIV POL 435	
	1.0062	YLAWYPAIK	IIIV POL 1227	
	1.0042	MYIQASPR	IIIV POL 859	
	25.0114	QWYIQASPR	IIIV EAG 45	
	1.0044	AYHIHQKPK	IIIV pol 1434	
	1.0043	KLGRWPKK	IIIV pol 1358	
	1.0042	KVYLAWYPAIK	IIIV pol 1225	
	1.0024	NTVFAIKK	IIIV pol 752	
	25.0062	RIVELGRR	IIIV ENV 53	
	25.0095	TKGGQCLK	IIIV POL 65	
	25.0078	TLFCASDAK	IIIV ENV 82	
	25.0104	VNIWQYDIR	IIIV ENV 88	
	1.0047	VTVYGVWPK	IIIV ENV 48	
B7	15.0068	YVLAQSPK	IIIV GAG 507	
	25.0113	HPVILGPA	IIIV GAG 248	
	15.0051	VPLNPL	IIIV com. REV 71	
その他	1.0031	EVNITDSQY	IIIV POL 1187	
	1.0014	FRDYVDRFY	IIIV GAG 298	
	25.0113	IWQCSGKLL	IIIV ENV 69	
	25.0127	IYETYGDVW	IIIV VPR 92	
	1.0050	IYQEPKNL	IIIV pol 1036	
	2.0129	IYQYMDOLY	IIIV pol 359	
	25.0128	PYNWETLEL	IIIV VPR 36	
	25.0123	PYNWPAI	IIIV POL 74	
	1.0057	RYLKIDQQL	IIIV ENV 278	
	1.0058	RYLQKQKLL	IIIV ENV 278	
	1.0053	TYQYQRPK	IIIV pol 1033	
	1.0057	TYQYMDOLY	IIIV pol 333	
	1.0052	VTYLDVGDAY	IIIV pol 265	
	1.0052	VWKEATTL	IIIV ENV 47	
	25.0115	VWKEATTLF	IIIV ENV 47	
	25.0218	VWKEATTLF	IIIV POL 56	
	25.0219	YVNTWPEW		

表5 (続き) HIV由来のCTLエピトープ

スーパータイプ	ペプチド	配列	供給源	配列番号
A2 A3	121.4	SLHMTLV	HIV MN en 60.81(a)	
	F105.1	AIQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.2	AIQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.3	AAIQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.04	AIAGSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.05	AIAPSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.06	AIQASMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.07	AIQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.08	AIQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.09	AIQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.11	AIQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.12	AIQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	F105.16	AIQSSMTK	HIV pol 337(a)	
	1145.03	FPVRQVPL	HIV nef 84-92 T <sup>907</sup>	
	1181.03	FPVRQVPL	HIV nef 84-92(a)	
D7	1292.14	HPVHAGPII	HIV GAG 248	
	1292.09	FPVSHETI	HIV POL 179	
	1145.02	FPVTRQVPL	HIV nef 84-92 T <sup>907</sup>	
	1145.22	FPVRMQVPL	HIV nef 84-92(a)	
	1181.04	FPVRQVPM	HIV nef 84-92(a)	
	1181.01	FPVRQVPM	HIV nef 84-92(a)	
	1181.02	FPVRQVPM	HIV nef 84-92(a)	
	1181.03	FPVRQVPM	HIV nef 84-92(a)	
	1181.06	FPVRQVPM	HIV nef 84-92(a)	
	1181.06	FPVRQVPM	HIV nef 84-92(a)	

【表7】

表7 P. falciparum由来のHTLエトープ

ペプチド	配列	供給源	配列番号
F125.04	KRWNVNIAVFLAMKLI	Pf SSP2 61	
1188.34	IRWNVNIAVFLAMKLI	Pf SSP2 62	
1188.16	KSKYKLTATSVLAGLL	Pf LSA1 12	
	LYNLIIRHNGIKHRE	Pf LSA1 13	
	LYNLIIRHNGIKHNS	Pf LSA1 14	
F125.03	LIJFHNGIKHNS	Pf LSA1 16	
27.0403	GLAYKEVVPKGAATPY	Pf SSP2 312	
1188.12	SSVFNVVNSSLGLM	Pf CSP 410	
27.0392	VKNVIGPPIKAVCIVE	Pf SSP2 223	
27.0417	MRELAILSVSSFLV	Pf CSP 2	
27.0388	MNYVYQKQENWYSLK	Pf CSP 33	
1188.38	KYKAGGAGGLALL	Pf CSP 44	
27.0408	QVQKQVYVSLVQV	Pf EXPI 82	
1188.13	QTNFKSLRNLOVSE	Pf LSA1 94	
27.0387	POSQDSLKSRKLN	Pf SSP2 165	
35.0171	KCNLYADSAWENVKN	Pf LSA1 105	
35.0172		Pf SSP2 211	

【0254】

【表8】



表8 P. falciparum由来のCTLエピトープ

スーパータイプ	ペプチド	配列	供給源	配列番号
A2	1167.21	FLRPDLFLV	PFSSP2 14	
	1167.08	FLRPLDGL	PFSSP2 423	
	1167.12	VLADLLGNV	PFEXP1 80	
	1167.13	KILSVFLA	PFEXP1 2	
	1167.10	GLLGNVTV	PFEXP1 83	
A3	1167.18	ILSVSPFLV	PFEXP1 7	
	1167.19	VLLGGVGLV	PFEXP1 10	
	1167.35	LAKGKLVK	PFSSP2 311	
	1167.33	FLRPLDGL	PFSSP2 311	
	1167.43	VTGGNQVQR	PFSSP2 311	
B7	1167.24	ALFFHINK	PFEXP1 10	
	1167.28	GVSSEFLK	PFEXP1 105	
	1167.47	IVLSHSYK	PFEXP1 105	
	1167.51	LAKGKLVK	PFSSP2 310	
	1167.52	FLVNLRLI	PFSSP2 310	
A2	1167.03	MPLEIQAL	PFSSP2 311	
	1167.03	TYAGEPAF	PFSSP2 311	
	1167.14	FLRPDLFL	PFSSP2 311	
	1167.16	FMKAVCVQV	PFSSP2 311	
	1167.15	FLRPLDGL	PFSSP2 311	
B7	1167.03	FLRPLDGL	PFEXP1 91	
	1167.00	VLEGVNIV	PFEXP1 91	
	1167.03	LVQIRNLI	PFSSP2 126	
	1167.03	LVQIRNLI	PFSSP2 126	
	1167.03	LVQIRNLI	PFSSP2 126	
その他	16.0245	FVEALPQEV	PFSSP2 126	
	16.0040	FVEALPQEV	PFSSP2 126	
	1167.54	FVEALPQEV	PFSSP2 126	
	1167.35	FVEALPQEV	PFSSP2 126	
	1167.36	FVEALPQEV	PFSSP2 126	
	15.0184	FVEALPQEV	PFSSP2 126	
	16.0130	FVEALPQEV	PFSSP2 126	
	16.0077	FVEALPQEV	PFSSP2 126	
	1167.57	FVEALPQEV	PFSSP2 126	
	1167.55	FVEALPQEV	PFSSP2 126	

【0255】

【表9】

表9. MHCクラスII標的化配列に融合したMHCクラスIIエピートープをコードする発現ベクターによるT細胞増殖の活性化

免疫原	刺激ペプチド <sup>1</sup>		
	PADRE	OVA 323	CORE 128
peptide + CFA <sup>2</sup>	3.0 (1.1)	2.7 (1.2)	3.2 (1.4)
pEP2.(PAOS).(-)	-	-	-
pEP2.(AOS).(-)	5.6 (1.8)	-	-
pEP2.(PAOS).(sigTh)	5.0 (2.9)	-	2.6 (1.5)
pEP2.(PAOS).(IgαTh)	5.6 (2.1)	-	3.0 (1.6)
pEP2.(PAOS).(LampTh)	3.8 (1.7)	-	3
pEP2.(PAOS).(IiTh)	5.2 (2.0)	3.2 (1.5)	3.7 (1.5)
pEP2.(PAOS).(H2M)	3.3 (1.3)	-	2.8

<sup>1</sup>培養物の幾何平均は、S I ≥ 2

<sup>2</sup>増殖応答は、リンパ節において測定した。

【0256】

【表10】

表10 cDNAミニ遺伝子におけるCTLエピートプ

インビボでの免疫原性 (IFA)

ヒトトープ	配列	MHC拘束	MHC結合		CTL応答(幾何)	
			親和性	培養物の数	平均×/÷SD <sup>b</sup>	
			[IC30%(nM)]		ΔLU	
HBV Core 18	FLPSDFPSPV	A2.1	3	6/6	73.0 (1.1)	
HBV Env 335	WLSLLVPFV	A2.1	5	4/6	5.3 (1.6)	
HBV Pol 455	GLSRVVARL	A2.1	76	ND <sup>a</sup>	ND	
HIV Env 120	KLTPLCVTL	A2.1	102	2/5	6.4 (1.3)	
HIV Pol 476	ILKEPVHGV	A2.1	192	2/5	15.2 (2.9)	
HBV Pol 551-A	YMDDVVLGA	A2.1	200	0/6	-	
HBV Pol 551-V	YMDDVVLGV	A2.1	5	6/6	8.2 (2.3)	
HIV Env 49	TVYYGVPVWK	A11	4	28/33	13.4 (3.1)	
HBV Core 141	STLPETTVVRR	A11	4	6/6	12.1 (2.6)	
HBV Pol 149	HTLWKAGILYK	A11	14	6/6	13.1 (1.2)	

<sup>a</sup> ペプチドを、HLA-A2.1/K<sup>b</sup>H-2<sup>b</sup>11 トランスジェニックマウスにおいてIFA中のTヘルパー細胞ペプチドと同時に免疫することにより試験した。

<sup>b</sup> 陽性培養物の幾何平均CTL応答

<sup>c</sup> ND: 行わず

【0257】

【表11】

表11 HLA A2.1/K\*トランスジェニックマウスにおけるpMin.1 DNA構築物の  
免疫原性のまとめ

エピートープ	CTL応答 <sup>a</sup>	
	陽性培養物数/総数 <sup>b</sup>	幾何平均の応答陽性 培養物[ $\times/\div$ SD]
		ALU
HBV Core 18	9/9	455.5 [2.2]
HIV Env 120	12/12	211.9 [3.7]
HBV Pol 551-V	9/9	126.1 [2.8]
HBV Pol 455	12/12	738.6 [1.3]
HIV Pol 476	11/11	716.7 [1.5]
HBV Env 335	12/12	43.7 [1.8]
HBV Core 18 (Theradigm) <sup>c</sup>	10/10	349.3 [1.8]

<sup>a</sup> マウスを、pMin.1 DNAまたはTheradigm-HBVリボペプチドで免疫し、そして脾臓細胞培養物におけるCTL活性を、個々のペプチドエピートープでのインビトロ刺激の後に決定した。4つの独立した実験の結果を示す。

<sup>b</sup> 実施例V、CTL陽性培養物の規定のための材料および方法を参照のこと。

<sup>c</sup> HBV Core 18エピートープを含むTheradigm-HBVリボペプチドで免疫したマウスの応答。

【0258】

【表12】

表12 HLA A11/K<sup>b</sup>トランスジェニックマウスにおける免疫原性のまとめ

エпитープ	CTL応答 <sup>a</sup>	
	陽性培養物数/総数 <sup>b</sup>	幾何平均の応答陽性 培養物[×/÷SD]
HBV Core 141	5/9	ΔLU 128.1 [1.6]
HBV Pol 149	6/9	267.1 [2.2]
HIV Env 43	9/9	40.1 [2.9]

<sup>a</sup>マウスをpMin.1 DNAで免疫し、そして脾臓細胞培養物におけるCTL活性を、個々のA11拘束したエпитープでのインビトロ刺激の後に決定した。3つの独立した実験の幾何平均CTL応答を示す。

<sup>b</sup>CTL陽性培養物の規定は、実施例V、材料および方法に記載される。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

図1は、マウスI i 遺伝子と、I i タンパク質のCLIP配列に置換された汎DRエпитープ配列との融合物をコードするI i PADRE構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号1および2）を示す。

##### 【図2】

図2は、複数のMHCクラスIIエпитープに融合したI i タンパク質の細胞質ドメイン、膜貫通ドメインおよび管腔ドメインの部分の融合物をコードするI 80 T構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号3および4）を示す。

##### 【図3】

図3は、I i タンパク質の三量体化領域をコードする、複数のTヘルパーエピトープおよびI i タンパク質のアミノ酸残基101～215に融合したI i タンパク質の細胞質ドメイン、膜貫通ドメインおよび管腔ドメインの部分の融合物をコードするI i Thful構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号5および6）を示す。

##### 【図4】

図4は、複数TヘルパーエпитープならびにLAMP-1の膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインに融合したマウス免疫グロブリン $\kappa$ シグナル配列の融合物をコードする $\kappa$ LAMP-Th構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号7および8）を示す。

【図5】

複数のMHCクラスIIエпитープならびにH2-Mの膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインに融合したH2-Mのシグナル配列の融合物をコードするH2M-Th構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号9および10）を示す。

【図6】

図6は、複数のMHCクラスIIエпитープならびにH2-DOの膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインに融合したH2-DOのシグナル配列の融合物をコードするH2O-Th構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号11および12）を示す。

【図7】

図7は、インフルエンザマトリクスタンパク質のアミノ末端に融合した汎DRエпитープ配列の融合物をコードするPADRE-インフルエンザマトリクス構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号13および14）を示す。

【図8】

図8は、B型肝炎表面抗原のアミノ末端に融合した汎DRエпитープ配列の融合物をコードするPADRE-HBV-s構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号15および16）を示す。

【図9】

図9は、複数のMHCクラスIIエпитープならびにIg- $\alpha$ タンパク質の膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインに融合したIg- $\alpha$ タンパク質のシグナル配列の融合物をコードするIg- $\alpha$ Th構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号17および18）を示す。

【図10】

図10は、複数のMHCクラスIIエピトープならびにIg- $\beta$ タンパク質の膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインに融合したIg- $\beta$ タンパク質のシグナル配列の融合物をコードするIg- $\beta$ Th構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号19および20）を示す。

【図11】

図11は、複数のMHCクラスIIエピトープに融合した $\kappa$ 免疫グロブリンのシグナル配列の融合物をコードするSigTh構築物のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号21および22）を示す。

【図12】

ヒトHLA-DRの非改変体（Ii）タンパク質のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号23および24）を示す。

【図13】

図13は、ヒトリソソーム膜糖タンパク質-1（LAMP-1）のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号25および26）を示す。

【図14】

図14は、ヒトHLA-DMBのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号27および28）を示す。

【図15】

図15は、ヒトHLA-DO $\beta$ のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号29および30）を示す。

【図16】

図16は、ヒトMB-1 Ig- $\alpha$ のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号31および32）を示す。

【図17】

図17は、ヒトIg- $\beta$ タンパク質のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号33および34）を示す。

【図18】

図18は、複数のMHCクラスIIエピトープに融合したMHCクラスII標的化配列をコードするいくつかの構築物を作製する方法を示す模式図を示す。

## 【図19】

図19は、ベクターpEP2のヌクレオチド配列（配列番号35）を示す。

## 【図20】

図20は、ベクターpMIN.0のヌクレオチド配列（配列番号36）を示す。  
。

## 【図21】

図21は、ベクターpMIN.1のヌクレオチド配列（配列番号37）のヌクレオチド配列を示す。

## 【図22】

pMin.1 DNAで免疫したHLA-A2.1/K<sup>b</sup>-H-2<sup>b\*8</sup> マウスにおける代表的なCTL応答。ブライムした動物からの脾細胞は、三連のフラスコ中で培養され、そしてインビトロで各ペプチドエピトープを用いて2回刺激された。各培養物の細胞傷害性は、ペプチドの存在（黒記号、実線）または非存在（白記号、点線）下で、Jurkat-A2.1/K<sup>b</sup>標的細胞に対する<sup>51</sup>Cr放出アッセイにおいてアッセイされた。各記号は、単一培養の応答を示す。

## 【図23】

DNAミニ遺伝子でトランスフェクトしたJurkat-A2.1/K<sup>b</sup>腫瘍細胞による、特定のCTLへのウイルスエピトープの提示。2つの構築物は、トランスフェクション（pMin.1およびpMin.2-GFP）に使用された。pMin.2-GFPをトランスフェクトされた標的細胞は、FACSにより選別され、そして本実験に使用された集団は60%の蛍光細胞を含んだ。CTL刺激は、IFN- $\gamma$ 放出の量を定量することによって（A、B）、または<sup>51</sup>Cr標識標的細胞の溶解によって（C、D、灰色のバー）、測定された。CTLは、1 $\mu$ g/mlのペプチド（B、D）の存在下で、トランスフェクトした細胞を用いて（A、C）、または親Jurkat-A2.1/K<sup>b</sup>細胞を用いて、刺激された。エピトープの非存在下において、IFN- $\gamma$ 放出のレベルおよび異なるCTL株の細胞傷害性は、それぞれ、72~126pg/mlおよび2~6%に変動した。

## 【図24】



インビボでの免疫原性に重要である変動性に取り組むために使用される改変したミニ遺伝子構築物の概要。以下の改変は、プロトタイプpMin. 1構築物中に組み込まれた；A、PADRE HTLエピトープの欠失；B、9位にアラニンを含むネイティブなHBV Pol 551エピトープの取り込み；C、Ig $\kappa$ シグナル配列の欠失；およびD、HBV Env 335およびHBV Pol 455エピトープのスイッチング位置。

#### 【図25】

pMin. 1免疫原性に影響し得る変動性の試験。pMin. 1のインビボでのCTL誘導活性は、改変した構築物と比較される。比較の容易さのために、各々の改変したDNAミニ遺伝子構築物により誘導されたCTL応答（灰色のパネル）は、各々の4つのパネルにおいて、プロトタイプpMin. 1構築物により誘導された応答（黒いパネル）に別々に比較される。2～5つの独立した実験からのCTL陽性培養の幾何平均応答が、示される。各々のバーで示される数は、陽性培養物の数/その特定のエピトープについて試験した総数を示す。陽性培養物/pMin. 1群について試験した合計の比は、パネルAに示され、そして残りの図のパネルについても同様である（実施例V、材料および方法、インビトロCTL培養、陽性CTL培養の定義についてを参照のこと）。The radigm応答は、リポベプチドで動物を免疫すること、ならびにHBV Core 18-27ペプチドで脾細胞培養物を刺激および試験することによって得られた。

【図1】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCCGCCACCATGGATGACCAAGCGGACCTCATCTCTAACCATGAGCAATTGCCCACTATCTGGCA
CGATCGCGGGCGTGGTACTTACTCTGCTTGGCTGGAGTAGAGATTGGTACTCGTTAACGGGTATGACCCGT
      M D D Q R R D L I S N H E Q L F I L G>

      80      90      100      110      120      130      140
      *      *      *      *      *      *      *
ACCGCCCTAGAGAGCCAGAAAGGTGCAAGCGGTGGAGCTCTGTACACCGGTGTTCTGTCTCGTGGCTCT
TGGCGGGATCTCTCGTCTTTCCACCTGGCAACCTCGAGACATGTGGCCACAAAGACAGGACCAACCGAGA
N R P R R E P E R C S R G A L Y T G V S V L V A L>

      150      160      170      180      190      200      210
      *      *      *      *      *      *      *
GCTCTGGCTGGCGAGGCCACCACTGCTTACTCTCTGTATACGGCAACGGGCCGCTTAGACAGGTGACCC
CGAGAACCGACCCGTCCTGGTGGTACGATGAGAGACATGGTGGTGTCTCCGCGGATCTGTCTGACTGG
      L L A G Q A T T A Y F L Y Q Q G R L D K K L T>

      220      230      240      250      260      270      280
      *      *      *      *      *      *      *
ATCAGCTCCAGAACCTGCAACTGGAGAGCCTTGGCATGAAGCTTCCGAAATCTGCCAAACCTGTGGCCA
TAGTGGAGGCTCTTGGACGCTGACCTCTGGAGAGCGATTTCGAAGCGTTTAGACGCGTTTGGACACCGT
      I T S Q N L Q L E S L R M K L F K S A E F V A>

      290      300      310      320      330      340      350
      *      *      *      *      *      *      *
AGTCTGTGGCTGCGCTGGACCTGAAGGCTGCGCTATGTCCATGGATAACATGCTCTTGGGCTGTGAA
TCAGGACCGACGGACCTGGGACTTCGAGCGGGATACAGGTACCTATTGTACGAGGAAACCCGGACACTT
      K P V A A W T L K A A A M S M D N M L L G F V K>

      360      370      380      390      400      410      420
      *      *      *      *      *      *      *
GAGCGTTACCAAGTACGGCAACATGACCCAGGACCATGTGATGCATCTGCTCAAGAGGTCTGGACCCCTG
CTTGCATGGTTTCATGCGGCTGTACTGGGTCTGGTACACTACGTAGACAGTGCTCCAGACCTGGGGAC
      N V T K Y G N M T Q D H V M H L L T R S G F L>

      430      440      450      460      470      480      490
      *      *      *      *      *      *      *
GAGTACCCCGACCTGAAGGGGACCTTCCCGAGAACTCTGAAGCATCTTAAGAATCCATGGATGGCGTGA
CTCATGGCGCTGACTTCCCTCGAAGGGTCTCTAGACTTCTAGAAATCTTGAAGTACCTACCGCACT
      E Y P Q L X G T Y P E N L K H L K N S M D G V>

      500      510      520      530      540      550      560
      *      *      *      *      *      *      *
ACTGGAGATCTTCGAGAGCTGGATGAAGCAGTGGCTCTTGTGTGAGTGAAGCAAGAACTCTCGGAGGA
TGACTTCTGAAGACTCTCGACTACTTGTCTACCGGAGAACAACTCTACTCGTCTTGGGGACCTCTCT
      N W K I F E S W M K Q W L L F E M S K N S L E E>

      570      580      590      600      610      620      630
      *      *      *      *      *      *      *
GAGAAGGCCACCGAGGCTCCACCTTAAGAGGCCACTGACATGGAGACTTACTCTTGGCTGGAGGTG
CTTCTCGGCTGGCTCGAGGTGAGTCTTCTGGTGAAGTACTCTTGGATGAAGACCGGACCTCCAC
      K K P T E A P P K E P L D M E D L S S G L G V>

      640      650      660
      *      *      *      *      *      *
ACGAGCGAGGACTGGGTCAAGTCACCGCTGTGAGGTACC
TGCTCGTCTTGGACCACTTCTGGTGGGACACTCCATGG
      T R Q E L G Q V T L >

```

FIGURE 1

【図2】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCCGACCCATGGATGACCAACGGACCTCATCTTAACCATGAGCAATTGCCATATCTGGCA
CGATCGGGCGGTGTACTTACTGTGTTCGCTGGAGTAGAGATTGGTACTCGTTAAACGGGTATGACCCGT
      M D D Q R D L I S N H E Q L F I L G>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
ACCGCCCTGAGAGGCCAGAAAGGTGCAGCCGCTGGAGCTCTGTACACCGGTGTTTCTGTCTCTGGGTCTCT
TGGCGGGATCTCTCGGTCTTTCCACCTCGGCACTCGAGACATGTGGCCACAAAGACAGGACACCGGAGA
N R P R E P E R C S R G A L Y T G V S V L V A L>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
GCTCTTTGGCTGGGCAAGGCCCACTGCTTACTTCTGTATCCAGCAACAGGGCCGCTAGACAAGCTGACC
CGAGAACCGACCCGTCGCGGTGTACGAATGAGGACATGGTCTGTGTCCCGGGGATCTGTGTGACTGG
L L A G Q A T T A Y F L Y Q Q Q G R L D K L T>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
ATCACTCTCCAGAACCTGCACTGGAGAGCCTTCGCATGAAGCTTATCAGCCAGGCTGTGCACGCGGCTC
TAGTGGAGGGTCTTGGACGTTGACCTCTCGAAGCGTACTTCAATAGTCGGTCCGACAOGTGGCGGAG
I T S Q N L Q L E S L R M K L I S Q A V H A A>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
ACGCCGAATCAACGAAGCTGGAAAGAACCCCTCCAGCTTATCGCCCTCCAAACGCTCTCTATCTGTCTT
TGGCGCTTAGTTGCTTCGACCTCTTGGGAGGTCAATAGCGGGAGGTTTGGAGGATAGGACAAAGAA
H A E I N E A G R T P P A Y R P P N A P I L F F>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
TCTGCTAGCAGAAATCTGACAAATCCCGAGTCCCTGAGCGCAAGTTCTGTGGCTGCCTGGACCTGAAAG
AGACGACTGTCTTAGGACTGTTAGGGGTCAAGGACCTCGGTTCAGACACCGACGACCTGGGACTTC
L L T R I L T I P Q S L D A K F V A A W T L K>

      430
      *      *
GCTGCGGCTTGAGGTACC
CGAGCGGAACCTCCATGG
      A A A *>

```

FIGURE 2

【図3】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCCGCCACCATGGATGACCAAGCGACCTCATCTTAACCATGAGCAATTGCCATACTGGGCA
CGATCGCGCGGGTGGTACTACTGCTTGGCTGGAGTAGAGATTGGTACTCGTTAAAGGGATGACCCGT
      M D D Q R D L I S N H E Q L P I L G>

      80      90      100      110      120      130      140
      *      *      *      *      *      *      *
ACGCGCTAGAGAGCCAGAAAGGTGCAGCGGTGGAGCTCTGTACACCGGTVITTCGTGCTGGTGGCTCT
TGGCGGAGTCTCTCGGTCTTTCCACGTCGGACCTCGAGACATGTGGCCACAAAGACAGGACCCAGGA
N R P R E P E R C S R G A L Y T G V S V L V L A>

      150      160      170      180      190      200      210
      *      *      *      *      *      *      *
GCTCTTGGCTGGGAGGCGACCTACTGCTTACTTCTGTACACGCAACAGGCGCGCTAGACAAGCTGACC
CGAGAACCGACCCCTCGGTGGTGTACGAATGAAGGACATGGTGGTGTCCGCGGATCTCTTGGATGG
L L A G Q A T T A Y F L Y Q Q G R L D K L T>

      220      230      240      250      260      270      280
      *      *      *      *      *      *      *
ATCACCTCCAGAACCTTGCACTGGAGAGCTTGGCATGAAGCTTATCACGCCAGGCTCTGCACGCCCGCT
TAGTGGAGGGTCTTGGAGCTTGAAGCTCTCGGAAGCGTACTTCGAATAGTGGTCCGACACGTGGCGGAG
I T S Q N L Q L E S L R M K L I S Q A V H A A>

      290      300      310      320      330      340      350
      *      *      *      *      *      *      *
ACGCCAAATCAACGAAGCTGGAAGAACCCTCCAGCTTATCGCCCTCCAAACGCTCTCTATCTGTCTT
TCCGCGTTTAGTTGCTTCGACCTCTTGGGGAGGTGGAATAGCGGGAGTTTGGAGGATAGGACAAGAA
H A E I N E A G R T P P A Y R P P N A P I L F F>

      360      370      380      390      400      410      420
      *      *      *      *      *      *      *
TCTCTGACUAGAATCTTGACAATCCGCCAGTCCCTGGACGCCAAGTTCTGGCTGCCTGGACCTGAAG
AGACGACTGGTCTTAGGACTGTTAGGGGGTCAGGGACCTCGGTTCAAGCACCGAAGGACCTGGGACTC
L L L T R I L T I F Q S L D A K F V A A N T L K>

      430      440      450      460      470      480      490
      *      *      *      *      *      *      *
GCTCGCGCTATGTCATGGATAACATGCTCCTTGGGCTGTGAAGAACGTTACCAAGTACGGCAACATGA
CSAAGCGGATACAGGTACCTATTGTACGAGGAACCCGGACCTCTTGCATGGTTCATCGCGTGTACT
A A A M S M D N M L L G P V K N V T K Y G N M>

      500      510      520      530      540      550      560
      *      *      *      *      *      *      *
CCGAGAACCATGTGATGCATCTGCTACAGAGGCTCTGACCCCTGGAGTACCCGAGCTGAAGGGGACCTT
GGGTCTGTGATCACTACGTAGACAGGTCTCCAGACCTGGGACCTCATGGCGTGGACTTCCCGTGA
T Q D H V M H L L T R S G P L E Y P Q L K G T F>

      570      580      590      600      610      620      630
      *      *      *      *      *      *      *
CCGAGAAATCGAAGCATCTTAAAGAACTCCATGGATGGGTGAAGTGAAGATCTTCGAGAGCTGGATG
GGTCTCTTAGACTCTGTAGAAATCTTGGGTACCTACGACCTTGAACCTTCTGAAGAGCTCTGACCTAC
P E N L K H L K N S M D G V N W K I F E S W M>

```

FIGURE 3

【図3-1】

```

      640      650      660      670      680      690      700
      *      *      *      *      *      *      *
AAGCAGTGGCTCTTGTGAGATGAGCAAGAACTCCCTGGAGGAGAAGAGCCACCGAGGCTCCACCTA
TTGGTCACCGAGAACAACTCTACTCGTTCTTGAAGGACCTCCTCTCTTCGGGTGGCTCCGAGGTGGAT
K Q W L L F E M S K N S L E E K K P T E A P P>

      710      720      730      740      750      760      770
      *      *      *      *      *      *      *
AAGAGCCACTGGACATGGAGACCTATCTTCTGGCCCTGGAGTGACCGAGSCAGGAACCTGGGTCAAGTCAC
TTCTGGGTGACCGTACCTTCTGGATAGAAAGACCGGACCTCACTGGTCCGTCCTTGACCCAGTTCAGTG
K E P L D M E D L S S G L G V T R Q E L G Q V T>

      780
      *      *
CCTGTGAGGTACC
GGACACTCCATGG
L *>

```

FIGURE 3 CONTINUED

【図4】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCGCCACCATGGAATGCAGGTGCAGATCCAGAGCCTGTTCTGCTCCTCCTGTGGTGCCTGG
CGATCGCGCGGTGGTACGCTTACGTCCAGCTCTAGGTCTCGGACAAAGACGAGGAGGACACCCACGGGC
      M G M Q V Q I Q S L F L L L L W V P>

      80      90      100      110      120      130      140
      *      *      *      *      *      *      *
GGTCAGAGGAATCAGCCAGGCTGTGCAACCGCTCCACGCGAAATCAACGAAGCTGGAAGAACCCCTCC
CGAGTCTCCTTGTAGTCCGTCCGACACGTGCGGCGAGTGGCGCTTAGTTGCTTCGACCTTCTTGGGAGG
G S R G I S Q A V H A A H A E I N E A G R T P P>

      150      160      170      180      190      200      210
      *      *      *      *      *      *      *
AGCTTATCGCCCTCCAAACGCTCCTATCCTGTGTTCTTCTGCTGACCAAGATCCTGACAAATCCCCAGTCC
TCGAATACCGGAGGTTTTCGAGGATAGGACAGAAAGACGACTGTGCTTAGGACTGTTAGGGGGTCAAG
A Y R P P N A P I L F F L L T R I L T I P Q S>

      220      230      240      250      260      270      280
      *      *      *      *      *      *      *
CTGGACGCGCAGTTCTGTGGCTGCCTGGACCTGAAGGCTGCCGCTAACACATGTTGATCCCCATTGCTG
GACCTCGGTTCAAGCACCGACGGACCTCGGAGCTTCCGACGGCGATTGTTGTACAACTAGGGGTAAAGAC
L D A K F V A A W T L K A A A N N M L I P I A>

      290      300      310      320      330      340      350
      *      *      *      *      *      *      *
TGGCGGTGCGCCCTGGCAGGGCTGGTCTCATCTGCTCATTGCTACCTCATTTGGCAGGAAGAGGAGTCA
ACCCGCCACGGGACCGTCCCGACCAAGAGTAGCAGGAGTAACGGATGGAGTAACCGTCTTCTCTCTCAGT
V G G A L A G L V L I V L I A Y L I G R K R S H>

      360      370
      *      *      *
CGCCGGCTATCAGACCATCTAGGGTACC
GCGGCGGATAGTCTGGTAGATCCCATGG
A G Y Q T I *>

```

FIGURE 4

【図5】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCGCGCACCATGGCTGCACTCTGGCTGCTGCTGCTCCTCAGTCTGCACTGTATGGGGATCA
CGATCGCGGGGGTGGTACCGACGTGAGACGACGACGACGACGACGAGTCAAGACGTGACATACCCCTAGT
      M A A L W L L L V L S L K C M G I>

      80      90      100      110      120      130      140
      *      *      *      *      *      *      *
GCCAGGCTGTGCACGCGCGCTCAGCCGGAATCAAGAGCTGGAAGAACCCTCCAGCTTATGCGCCCTCC
CGGCTCCGACACGTGCGCGAGTUCGGCTTTAGTTGCTTCGACCTTCITGGGGAGGTGGAATAGCGGGAGG
S Q A V H A A H A E I N E A G R T P P A Y R P P>

      150      160      170      180      190      200      210
      *      *      *      *      *      *      *
AAACGCTCCTATCCTGTTCTTCTGCTGACCGAATCTGACAAATCCCCAGTCCCTGGACGCCAAGTTC
TTTCCAGGATAGGACACAGAAAGACGACTGGTCTTAGGACTGTTAGGGGGTCAAGGACCTGCGGCTTCAK
N A F I L F F L L T R I L T I F Q S L D A K P>

      220      230      240      250      260      270      280
      *      *      *      *      *      *      *
GTGGCTGCTGGACCCCTGAAGGCTGCCGCTAAGGCTCTGTGTCTGCAAGCAACCCCTGGGCGCTGGCTTCA
CAACCAAGCACTGGGACTTCCGACGGCGATTCCAGAGACACAGACGTGCGTGGGACCCGGACCCGAAGT
V A A W T L K A A A K V S V S A A T L G L G F>

      290      300      310      320      330      340      350
      *      *      *      *      *      *      *
TCATCTTGTGTGGCTTCTTCAGATGGCGCAAGTCTCATTCCTCCAGCTACACTCCTCTCCCTGGATC
AGTAGAGACACACCAACGAAGAAGTCTACCGCTTTCAGAGTAAGGAGGTTCGATGTGAGGAGAGGGACCTAG
I I F C V G F F R W R K S H S S S Y T P L P G S>

      360      370      380
      *      *      *
CACCTACCCAGAAGGACGGCATTAGGGTACC
GTGGATGGGTCTTCTGCGTAATCCCATGG
T Y P E G R H *>

```

FIGURE 5

【図6】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCGCCACCATGGGCGCTGGAGGGGCCCTGGGTGGTGGCTCTGTGGTGAACCTCATGAGGC
CGATCGCGCGGTGGTACCGCGGACCTCCCGGGGACCCACCACGAGACAACCACTTGGAGTACTCCG
      M G A G R A P W V V A L L V N L M R>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
TGGATTCCATCAGCCAGGCTGTGCAGCGCGCTCAGCGCGAAATCAACGAGCTGGAGAACCCTCCAGC
ACCTAAGGTAGTCCGTCCGACACCTGCCGCGAGTGCAGCTTTAGTTGCTTCGACCTTCTTGGGAGGTCC
L D S I S Q A V H A A H A E I N E A G R T P P A>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
TTATCGCCCTCCAAACGCTCCTATCCTGTTCTTTCTGTGACCAAGATCCTGACAATCCCCAGTCCCTG
AATAGCGGAGGTTTGCAGGATAGGACAAGAAAGACGACTTGTCTTAGGACTGTATTAGGGGTCAGGGAC
Y R P P N A P I L F F L L T R I L T I P Q S L>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
GACGCCAAGTTTCGTGCTGCTGGACCCCTGAAGCGCTGCCCTATACTGAGTGGAGCTGCAGTGTTCCCTGC
CTGCGGTTCAAGCACCGACCGGACCTGGGACTTCGGACGCGATATGACTCACCTCGAAGTCACAGGGACG
D A K F V A A W T L K A A A I L S G A A V F L>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
TTGGGCTGATTGTCTTCCTGGTGGGGGTGTTATCCATCTCAAGGCTCAGAAAACATCTGTGGAGACTCA
AACCCGACTACAGAAGGACCAACCCCAACAATAGGTAGAGTTCCGAGTCTTTCTAGACACCTCTGAGT
L G L I V F L V G V V I H L K A Q K A S V E T Q>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
GCCTGGCAATGAGAGTAGTCCCGGATGATGGAGCGGCTAACCAAGTTCAAGGCTGGACCGGACATGTC
CGGACCGTTACTCTCATCCAGGGCCTACTACCTCGCCGATTGTTCAAGTCCGACCTGGCCCTGTACAG
P G N E S R S R M M E R L T K F K A G P G H V>

      430
      *
      *
ACATGAGGTACC
TGTACTCCATGG
      T*>

```

FIGURE 6



【図7】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCCGCGCCACCTAGGCCAAGTTCTGTGCTGCTGGACCTTGAAGGCTTCCCGCTATGAGTCTTCTTAA
CGATCGCGCGCGGTGTGTACCGGTTCAAGCAACGACCGGACTCGGACTTCGACGCGGATACCTCAGAGATT
      M A X F V A A W T L K A A A M S L L
      *      *      *      *      *      *      *

      80      90      100      110      120      130      140
      *      *      *      *      *      *      *
CCGAGGCTCAGAACTACGCTTCTCTCATCTCATCGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCGAGACT
GCTCTGAGCTTTTGATCGCAAGAGAGATAGAGGTAGTCGCGGCGAGTTTCGACTCTAGCGGCTCTCTGA
T E V E T Y V L S I I P S G P L K A E I A Q R L>
      *      *      *      *      *      *      *

      150      160      170      180      190      200      210
      *      *      *      *      *      *      *
TGAAGATGTTTTTCAGCGGAAAGACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAGACAAAGACCAATC
ACTCTTACAGAAAGGTCCCTCTCTGTCTGAACTCCGAGAGTACTTACGATTTCTGTCTGGTTAG
E D V F A G K N T D L E A L H E W L K T R P I>
      *      *      *      *      *      *      *

      220      230      240      250      260      270      280
      *      *      *      *      *      *      *
CTGTCACTCTGACTTAAGGGAATTTAGGGTTTGTGTTCAAGCTCACCGTCCCACTGAGCGAGGACTGC
GACACTGGAGACTGATTCGCTTAAATCCCAAGCAAGTGGCAGTGGTCACTGGCTCTGAGG
L S P L T K G I L Q F V F T L T V P S E R G L>
      *      *      *      *      *      *      *

      290      300      310      320      330      340      350
      *      *      *      *      *      *      *
AGCGTAGAGATTGTGTCAGAAATGCCATAATGGGAATGGAGACCCAAACACATGGACAGGCGAGTTAA
TGGCATCTGTAAACAGGTTTACGGGATTAACCTTACTCTCGGTTTGTGTACCTGTCGGTCAATT
Q R R R P F V Q N A L N G N G D P N H M D R A V K>
      *      *      *      *      *      *      *

      360      370      380      390      400      410      420
      *      *      *      *      *      *      *
ACTATACAGGAAGCTGAGAGGGAAATGACATTCATGGAGCCAGGAAGTTTGCACTCACTTACTCACT
TGATATGTTCTTUSACTTCTGCTTACTCTTAAAGTACTCTTCTCTTCAAGTGAATGAGTGA
L Y K K L K R E H T F H S A K E V A L S Y S T>
      *      *      *      *      *      *      *

      430      440      450      460      470      480      490
      *      *      *      *      *      *      *
GGTGGCTTGGCAGTTGCATGGTCTCATATACACCGGATGGGAACAGTGAACACAGAGATGGCTCTTG
CCAGCGGAACGGTCAACCTACACAGAGTATATGTTGGCTTACCTTGCACTGGTCTTTCACCGAGAAC
G A L A S C H G L I Y N R N G T V T T E V A L>
      *      *      *      *      *      *      *

      500      510      520      530      540      550      560
      *      *      *      *      *      *      *
GCGTAGTATGTGCCACTTGTGACAGATTGTGTATGCCCAACATCGTTCACAGCGAGATGGGACTAC
CGATCATACACGGTGAACTCTGTCTAACGACTACGGTTGTAGCGAGGTTGTCGCTCAACCTGATG
G L V C A T C E Q I A D A Q H R S M R Q M A T T>
      *      *      *      *      *      *      *

      570      580      590      600      610      620      630
      *      *      *      *      *      *      *
CACCAACCCCAATATCAGGATGAGACAGAAATGGTACTAGCCAGCACTACGGCTAAGGCCATGGAGCAA
GTGTTGGGTGATTAGTCTGCTTGTGCTTACCATGATCGTCTGTATGGCGAATTCGGTACCTCGTT
T N P L I R E E N R M V L A S T T A K A M E Q>
      *      *      *      *      *      *      *

      640      650      660      670      680      690      700
      *      *      *      *      *      *      *
ATGGCTGATCAATGTGACGAGCAGCAGAGGCCATGGAACTGCAAGTCAAGGCTAGCAAAATGTCAGS
TACCGACTAGTTCACTCTCTCTGCTCTCGTACTCTAGCGTTCACTGCGATCTGTTTACACGGTCC
M A G S S E Q A A E A M E V A S Q A R Q M V Q>

```

FIGURE 7

【図7-1】

```

      710      720      730      740      750      760      770
      *      *      *      *      *      *      *
CAATGAGGACAAATGGGACTCACCCCTAGCTCCAGTCCAGGTTCTAAAAGATGATCTTATTGAAAATTTCGA
GTACTCTCTGTTAACCTCGAGTGGGATCGAGGTCACTCCAGATTTCTACTAGAAATAACTTTTAAAGCT
A M R T I G T H F S S S A G L K D D L I E N L Q>

      780      790      800      810
      *      *      *      *
GGCTTACCAGAAACGGATCGGGGTGCAGATCCAGCGATTCAAGTGA
CCGAATGCTCTTTGCTACCCCCACGTCTACGTGCTAAGTTCACT
A Y Q K R M G V Q M Q R F K *>

```

FIGURE 7 CONTINUED

【图8】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCCGCGCCACCATGGCCAAAGTTCTGGCTGGCTGGACCTGAAGGCTGCCGCTCTCGAGATTGGGG
CGATCGCGCGCGTGTACCGGTTCAAGCACCGACGGACCTGGGACTCTCCACGGCGAGAGCTCTTAACCCC
      M A K F V A A W T L K A A A L E I G>

      80      90      100      110      120      130      140
      *      *      *      *      *      *      *
GACCTCTGCTGAACGCGGAGAACATCACATCAGGATTCTTAGACCCCTTCTCGTGTACAGGGGGGGTT
CTGGGACGGACTTGGGGCTCTTGTAGTGTAGTCTTAAGGATCTCGGGGAAGAGCAAAATGTCGCCGCCAA
G P C L N A E N I T S G F L G P L L V L Q A G F>

      150      160      170      180      190      200      210
      *      *      *      *      *      *      *
TTCTGTGTTGACAGAATCCTCAAAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTA
AAAGAACAACTGTTCTTAGGAGTGTATTGGGCTCTCGAGATCTGACCAACCTGAAGAGAGTTAAAGAT
F L L T R I L T I F Q S L D S W W T S L N F L>

      220      230      240      250      260      270      280
      *      *      *      *      *      *      *
GGGGGAACACCGTGTGCTTGGCCAAAATTCGAGTCCCCAACCTCAATCACTCACCAACCTCTTCTC
CGCCCTGTATGGCACAGAACCGGTTTAAAGGTCAGGGGTTGGAGGTTAGTGAGTGGTGGAGAACAG
G G T T V C C L G Q N S Q S P T S N H S P T S C>

      290      300      310      320      330      340      350
      *      *      *      *      *      *      *
CTCCAACTTGTCTGTTATCGCTGGATGTGTCTGGGGGGTTTATCACTTCTCTCTTCATCTCGTGTCT
GAGGTTGACAGGACCAATAGCGACCTTACACAGACGCGCAAAATAGTAGAGGAGAGTAGGACGACGA
F P T C P G Y R W M C L R R F I I F L F I L L L>

      360      370      380      390      400      410      420
      *      *      *      *      *      *      *
ATGCGCTCACTTCTTGTGGTCTTCTGGACTATCAGGTATGTTGCCGTTTGTCTCTAATTCACGGA
TACGGATAGAAAGAACCAACCAAGAGAGCTGTATGTTCCATACACGGGCAACAGGAGATTAAAGTCTT
C L F L L V L L D Y Q G M L P V C P L I P G>

      430      440      450      460      470      480      490
      *      *      *      *      *      *      *
TCTCTCAACACGACGACGCGGACCATGCGCGACCTGCATGACTGTCTCAGGAACCTCTATGTATCCCT
AGGAGTTTGTGTGTGCTGCTGTGACGGCTGTGACCTACTGATGACGAGTTCTCTGGAGATACATAGGGA
S S T T S T S T G P C R T C M T T A Q G T S M Y P>

      500      510      520      530      540      550      560
      *      *      *      *      *      *      *
CCTGTTGCTGTACCAACCTTCGACGCGAAATTCACCTGTATCCCATCCCATCATCTCTGGCTTTGG
GGACAAACGACATGGTTTGGAGGCTGGCTTTAAGTGGACATAGGGTAGGGTAGTAGGACCCGAAAGGC
S C C C T K P S D G N C T C I P I P S S W A F G>

      570      580      590      600      610      620      630
      *      *      *      *      *      *      *
AAATTCCTATGGGAGTGGGCTCAGCCCGTTTCTCGTCTCAGTTTACTAGTGCCATTGTCTCAGTGG
TTTAAAGATACCTTCACCGGAGTGGGCAAGGGACCGAGTCAATGATCAGGTAAACAGTCAAC
X F L W E W A S A R F S W L S L L V P F V Q W>

```

FIGURE 8

【図8-1】

```

      640      650      660      670      680      690      700
      *      *      *      *      *      *      *
TTCCGTAGGGCTTTCCTCCCTACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGT
AAGCATCCCGAAGGGGGGTGACAAACCGAAAGTCAATATACCTACTACACCATAAACCCCGGTTTCAGACA
F V G L S P T V W L S V I W M M W Y W G P S L>

      710      720      730      740      750      760      770
      *      *      *      *      *      *      *
ACAGCATCTTGAGTCCCTTTTACGGCTGTACCAATTTTCCTTTGTCTTTGGGTATACATTTAAACCTT
TGTGCTAGAACTCAGGGAAATATGCGACAAATGTTTAAAGAAACAGAAACCCATATGTAATTTGGGA
Y S I L S F F L F L L F I F F C L W V Y I *>

      780      790      800
      *      *      *
AACAAACAAAGAGATGGGGTACTCTCTCAA
TTGTTTGTGTTCTTACCCCAATGAGAGATT

```

FIGURE 8 CONTINUED

【図9】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCGCGCAGCATGCCAGGGGGTCTAGAAAGCCCTCAGAGCCCTGCCTCTCCTCTCTCTTCTGTCAT
CGATCGCGCGCGGTGGTAGCGGTCGCCAGATCTTCGGGAGTCTCGGAGCGGAGAGCGAGAGAAACAGTA
      M P G G L E A L R A L P L L L F L S>

      80      90      100      110      120      130      140
      *      *      *      *      *      *      *
AGGCGCTGTTTCGGTCCGGATGCCAGGCCATCAGCCAGGCTGTGCAAGCCGCTCAGCGCGGAATCAACGA
TGGGGAGAAAGCCAGGGGCTTACGGTCCGGTAGTCCGTCCGACACGTCGGGGAGTTCGGGCTTTAGTTGCT
Y A C L G P G C Q A I S Q A V H A A H A E I N D>

      150      160      170      180      190      200      210
      *      *      *      *      *      *      *
AGCTGGAGAAAGCCCTCCAGCTTATCGGGCTCCAAAGCTTCCTATGCTGTCTCTCTGCTGACGAGAATC
TCGACGCTTCTTGGGGAGTTCGAATAGCGGGAGGTTTCGATAGGACAGAAAGACGACTGGTCTCTAG
A G R T F F A Y R F P N A P I L F F L L T R D>

      220      230      240      250      260      270      280
      *      *      *      *      *      *      *
CTGACAAATCCCGCATTCCTCGACGCCAAGTTCTGTGGTCCCTGGACCTGAAGGCTCCCGTGGATGA
GACTTTTAGGGGGTCCAGGACCTGGGGTTCAAGCGAGGAGGACCTGGGACTTCCGACGGCGGACCGCTAGT
L T I P Q S L D A K F V A A W T L K A A A G I D>

      290      300      310      320      330      340      350
      *      *      *      *      *      *      *
TCTTGGCTGCTCTGTGCACTGGTCCAGGGAGCGCTGGTCTCTATTTCAGGAAGCGCTGGCAAAATGAGAACTT
AGAAGCAGCAAGACACGCTCAGCAGGCTCCCTCGGACGAGATAGTCTCTTTCGACCGTTTACTCTTCAA
I L L F C A V V P G T L L L F R K R W Q N E K F>

      360      370      380      390      400      410      420
      *      *      *      *      *      *      *
TGGGTTGGCATGCGCAGATGACTATGAAGATGAJAATCTCTATGAGGGCCGGAACCTTGATGACTTCTT
AGCCGACCTGTACGGCTCTACTGATACTCTTACTCTTTAGAGATAGTCCCGGACTTCGAGTACTGACAGA
G V D M P D D Y E D E N L Y E G L N L D D C S>

      430      440      450      460      470      480      490
      *      *      *      *      *      *      *
ATGTATGAGGACATCTCCAGGGGACTCCAGGGGACCTACCAAGATGTGGGCAAGCTCCACATCTGAGATG
TACATCTCTCTGTAGAGTCCCTCAGGTCCTGGTGGATGGTCTACACCGGTTGGAGGTGTAACCTCTAC
M Y E D I S R G L Q G T Y Q D V G N L H I G D>

      500      510
      *      *
CCGAGCTGGAAGAGGCTACGCTACG
CGGTCGACGCTTTTCGGTACTCCATGG
A Q L E K F *>

```

FIGURE 9

【図10】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCGCCGACCATGGCCACACTGGTCTCTTCCATGCCCTGCCACTGGCTGTCTTCCCTCTGTC
CGATCGCGCGCGGTGATACGGTGTGACCAACGACAGAAGGTACGGGACGGTGACCGACAACAAGGACGCG
      H A T L V L S S H P C K W L L F L L D>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
TGCTCTTCTCAGGTGAGCGGATCAGCCAGGCTGTGCACGCGGCTCACCGCGAATCAACGAAGCTGGAAG
ACGAGAAGAGTCCACTGGCTAGTGGTCCGACACGTTGGCGAGTCCGGCTTTAGTTGCTTGGACCTTC
L L F S G E P I S Q A V H A A H A E I N E A G R>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
AAGCCCTCCAGCTTATCGCCCTCCAAAGGCTCTATCTCTGTCTTCTGCTGACCAAGTCTTACAACTC
TTGGGAGGTTCCAAATAGCGGGAGTTTGGGAGGATAGGACAAGAAAGGACTGGTCTTAGGACTGTTAG
T P F A Y R P P N A P I L F F L L T R I L T I D>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
CGCCAGTCCCTGGACGCCAAGTTGGTGGCTGGCTGGACCTTGAGGCTGCCCGTATTTATCTTGTATCCAGA
GGGCTCAGGACCTGGCGTTCAAGCACGGACGGACCTGGGACTTCCGACGGCGATATATAGAACTAGGCTCT
P Q S L D A K F V A A W T L K A A A I I L I Q>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
CGCTCTCATCATCTCTTCATCATGTGCCCCATCTTCTCTGCTACTTGCACAAAGGATGACGGCAAGGCTGG
GGGAGGAGTAGTAGGAGAGTAGTAACACGGGTAGAGGACGATGAAGTGTCTCTACTGGCGTTCCGAGCT
T L L I I L F I I V P H F L L L D K D D G K A G>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
GATGGAGGAAGATCACAGCTATGAGGGCTTGAACACTTACACAGACAGCCAGCTATGAAGACATAGTGAAT
CTAGCTCTCTTCTAGTGGATCTCCGAACCTGTAACTGGCTCTTCCGGTGGATACTTCTGTATCACTGA
M E E D H T Y E G L N I D Q T A T Y E D I V T>

      430     440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *      *
CTTCGGACAGGGAGGTAAAGTGGTGGTAGGAGGATCCAGGCGCAGGAATGAGGTACC
GAAGCCTCTTCCCTCCATTTCACAGCCATCTCTCGTAGGTCCGGTCTTACTCCAGG
L R T G E V K W S V G E H P G Q E >

```

FIGURE 10

【図11】

```

      10      20      30      40      50      60      70
OCTAGCGCGCCACCATGGGAATCCAGGTCCAGATCCAGAGGCTGTTTCGCTCTCTCTGTGGGTGCGCG
CGATCGCGCGCGGTGGTACCGTTACGTCACGTCCTAGGTCCTCGGACAAAGACGAGAGGACACCCACGGGC
      M G M Q V Q I Q S L F L L L L W V P>

      80      90      100      110      120      130      140
GGTCCCGAGGAATCAGCCAGGCTGTCCACGCGGCTCAGCGCGGAAATCAACGAAGCTCGAALGAACCGCTCC
CCAGGGCTCCTTAGTCGGTCCGACAGCTGCGCGGAGTCCGGGTTTACTTGGCTTCGACCTCTTTGGGAGG
G S R G I S Q A V H A A H A E I N E A G R T P P>

      150      160      170      180      190      200      210
AGCTTATCGCGCTCCAAACGCTCCTATCCTGTCTCTTCTGCTGACCAGAAATCCGTGACAAATCCCCAGTCC
TCSAATAGCGGGAGGTTTGGGAGGATAGGACAAGAAAGAGGACTGCTCTTAGGACTGTTAGGGGGTCAGG
A Y R P P N A P I L F F L L T R I L T I P Q S>

      220      230      240      250      260
CTGGACGCCAAGTTCGTGGCTGCGCTGGACCTGAGGCTGCCGCTTGAGGTACG
GACCTGCGGTTCAAGCACCGACGGACCTGGGACTTCCGACGGCGGAATCCATGG
L D A K F V A A W T L K A A A >

```

FIGURE 11

## 【図12】

TTCCAG ATG CAC AGG AGG AGA AGC AGG AGC TGT CGG GAA GAT CAG AAG Met His Arg Arg Arg Ser Arg Ser Cys Arg Glu Asp Gln Lys 1 5 10	49
CCA GTC ATG GAT GAC CAG CGC GAC CTT ATC TCC AAC AAT GAG CAA CTG Pro Val Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu 15 20 25 30	97
CCC ATG CTG GGC CGG CGC CCT GGG GCC CGG GAG AGC AAG TGC AGC CGC Pro Met Leu Gly Arg Arg Pro Gly Ala Pro Glu Ser Lys Cys Ser Arg 35 40 45	145
GGA GCC CTG TAC ACA GGC TTT TCC ATC CTG GTG ACT CTG CTC CTC GCT Gly Ala Leu Tyr Thr Gly Phe Ser Ile Leu Val Thr Leu Leu Leu Ala 50 55 60	193
GGC CAG GCC ACC ACC GGC TAC TTC CTG TAC CAG CAG CAG GGC CGG CTG Gly Gln Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gly Arg Leu 65 70 75	241
GAC AAA CTG ACA GTC ACC TCC CAG AAC CTG CAG CTG GAG AAC CTG CGC Asp Lys Leu Thr Val Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg 80 85 90	289
ATG AAG CTT CCC AAG CCT CCC AAG CCT GTG AGC AAG ATG CGC ATG GCC Met Lys Leu Pro Lys Pro Pro Lys Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala 95 100 105 110	337
ACC CGG CTG CTG ATG CAG GCG CTG CCC ATG GGA GCC CTG CCC CAG GGG Thr Pro Leu Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Gly Ala Leu Pro Gln Gly 115 120 125	385
CCC ATG CAG AAT GCC ACC AAG TAT GGC AAC ATG ACA GAG GAC CAT GTG Pro Met Gln Asn Ala Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Glu Asp His Val 130 135 140	433
ATG CAC CTG CTC CAG AAT GCT GAC CCC CTG AAG GTG TAC CCG CCA CTG Met His Leu Leu Gln Asn Ala Asp Pro Leu Lys Val Tyr Pro Pro Leu 145 150 155	481
AAG GGG AGC TTC CCG GAG AAC CTG AGA CAC CTT AAG AAC ACC ATG GAG Lys Gly Ser Phe Pro Glu Asn Leu Arg His Leu Lys Asn Thr Met Glu 160 165 170	529
ACC ATA GAC TGG AAG GTC TTT GAG AGC TGG ATG CRC CAT TGG CTC CTG Thr Ile Asp Trp Lys Val Phe Glu Ser Trp Met His His Trp Leu Leu 175 180 185 190	577

FIGURE 12



【図12-1】

TTT GAA ATG AGC AGG CAC TCC TTG GAG CAA AAG CCC ACT GAC GCT CCA	625
Phe Glu Met Ser Arg His Ser Leu Glu Gln Lys Pro Thr Asp Ala Pro	
195 200 205	
CCG AAA GAG TCA CTG GAA CTG GAG GAC CCG TCT TCT GGG CTG GGT GTG	673
Pro Lys Glu Ser Leu Glu Leu Glu Asp Pro Ser Ser Gly Leu Gly Val	
210 215 220	
ACC AAG CAG GAT CTG GGC CCA GTC CCC ATG TGAGAGCAGC AGAGGCGGTC	723
Thr Lys Gln Asp Leu Gly Pro Val Pro Met	
225 230	

FIGURE 12 Continued

## 【図13】

COGCTCGGC	ATG	GCG	CCC	GCG	AGC	GCC	CGG	CGA	CCC	CTG	CTG	CTA	229
Met	Ala	Pro	Arg	Ser	Ala	Arg	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	
1				5					10				
CTG	CCT	GTT	GCT	GCT	GCT	CGG	CCT	CAT	GCA	TGG	TGG	TCA	277
Leu	Pro	Val	Ala	Ala	Ala	Arg	Pro	His	Ala	Leu	Ser	Ser	
15						20				25			
TTT	ATG	GTG	AAA	AAT	GCG	AAC	GGG	ACC	GCG	TGC	ATA	ATG	325
Phe	Met	Val	Lys	Asn	Gly	Asn	Gly	Thr	Ala	Cys	Ile	Met	
30					35				40			45	
TCT	GCT	GCC	TTC	TCA	GTG	AAC	TAC	GAC	ACC	AAG	AGT	GCC	373
Ser	Ala	Ala	Phe	Ser	Val	Asn	Tyr	Asp	Thr	Lys	Ser	Gly	
				50					55			60	
ATG	ACC	TTT	GAC	CTG	CCA	TCA	GAT	GCC	ACA	GTG	GTG	CTC	421
Met	Thr	Phe	Asp	Leu	Pro	Ser	Asp	Ala	Thr	Val	Val	Leu	
			65				70					75	
TCC	TGT	GGA	AAA	GAG	AAC	ACT	TCT	GAC	CCC	AGT	CTC	GTG	469
Ser	Cys	Gly	Lys	Glu	Asn	Thr	Ser	Asp	Pro	Ser	Leu	Val	
		80					85				90		
GGA	AGA	GGA	CAT	ACA	CTC	ACT	CTC	AAT	TTC	ACG	AGA	AAT	517
Gly	Arg	Gly	His	Thr	Leu	Thr	Leu	Asn	Phe	Thr	Arg	Asn	
	95					100					105		
TAC	AGC	GTT	CAG	CTC	ATG	AGT	TTT	GTT	TAT	AAC	TTG	TCA	565
Tyr	Ser	Val	Gln	Leu	Met	Ser	Phe	Val	Tyr	Asn	Leu	Ser	
110				115					120			125	
CTT	CTC	CCC	AAT	GCG	AGC	TCC	AAA	GAA	ATC	AAG	ACT	GTG	613
Leu	Phe	Pro	Asn	Ala	Ser	Ser	Lys	Glu	Ile	Lys	Thr	Val	
			130					135				140	
ACT	GAC	ATC	AGG	GCA	GAT	ATA	GAT	AAA	AAA	TAC	AGA	TGT	661
Thr	Asp	Ile	Arg	Ala	Asp	Ile	Asp	Lys	Lys	Tyr	Arg	Cys	
			145					150				155	
ACC	CAG	GTC	CAC	ATG	AAC	AAC	GTG	ACC	GTA	ACG	CTC	CAT	709
Thr	Gln	Val	His	Met	Asn	Asn	Val	Thr	Val	Leu	His	Asp	
			160				165					170	
ATC	CAG	GCG	TAC	CTT	TCC	AAC	AGC	AGC	TTC	AGC	AGG	GGA	757
Ile	Gln	Ala	Tyr	Leu	Ser	Asn	Ser	Ser	Phe	Ser	Arg	Gly	
		175				180					185		

FIGURE 13

## 【图13-1】

TGT GAA CAA GAC AGG CCT TCC CCA ACC ACA GCG CCC CCT GCG CCA CCC Cys Glu Gln Asp Arg Pro Ser Pro Thr Thr Ala Pro Pro Ala Pro Pro 130 135 200 205	805
AGC CCC TGG CCC TCA CCC GTG CCC AAG AGC CCC TCT GTG GAC AAG TAC Ser Pro Ser Pro Ser Pro Val Pro Lys Ser Pro Ser Val Asp Lys Tyr 210 215 220	853
AAC GTG AGC GGC ACC AAC GGG ACC TGC CTG GGC AGC ATG GGG CTG Asn Val Ser Gly Thr Asn Gly Thr Cys Leu Ala Ser Met Gly Leu 225 230 235	901
CAG CTG AAC CTC ACC TAT GAG AGG AAG GAC AAC ACG ACG GTG ACA AGG Gln Leu Asn Leu Thr Tyr Glu Arg Lys Asp Asn Thr Thr Val Thr Arg 240 245 250	949
CTT CTC AAC ATC AAC CCC AAC AAG ACC TGG GGC AGC GGG AGC TGC GGC Leu Leu Asn Ile Asn Pro Asn Lys Thr Ser Ala Ser Gly Ser Cys Gly 255 260 265	997
GCC CAC CTG GTC ACT CTG GAG CTG CAC AGC GAG GGC ACC ACC GTC CTG Ala His Leu Val Thr Leu Glu Leu His Ser Glu Gly Thr Thr Val Leu 270 275 280 285	1045
CTC TTC CAG TTC GGG ATG AAT GCA AGT TCT AGC CGG TTT TTC CTA CAA Leu Phe Gln Phe Gly Met Asn Ala Ser Ser Ser Arg Phe Phe Leu Gln 290 295 300	1093
GGA ATC CAG TTG AAT ACA ATT CTT CTT GAC GCT AGA GAC CCT GGC TTT Gly Ile Gln Leu Asn Thr Ile Leu Pro Asp Ala Arg Asp Pro Ala Phe 305 310 315	1141
AAA GCT GCC AAC GGC TCC CTG CGA GCG CTG CAG GCC ACA GTC GGC AAT Lys Ala Ala Asn Gly Ser Leu Arg Ala Leu Gln Ala Thr Val Gly Asn 320 325 330	1189
TCC TAC AAG TGC AAC GCG GAG GAG CAC GTC CTT GTC ACG AAG GCG TTT Ser Tyr Lys Cys Asn Ala Glu Glu His Val Arg Val Thr Lys Ala Phe 335 340 345	1237
TCA GTC AAT ATA TTC AAA GTG TGG GTC CAG GCT TTC AAG GTG GAA GGT Ser Val Asn Ile Phe Lys Val Trp Val Gln Ala Phe Lys Val Glu Gly 350 355 360 365	1285
GGC CAG TTT GGC TCT GTG GAG GAG TGT CTG CTG GAC GAG AAC ACG ACG Gly Gln Phe Gly Ser Val Glu Glu Cys Leu Leu Asp Glu Asn Ser Thr 370 375 380	1333

FIGURE 13. CONTINUED

## 【図13-2】

CTG ATC CCC ATC GCT GTG GGT GGT GGC CTG GCG GGG CTG GTC CTC ATC	1381
Leu Ile Pro Ile Ala Val Gly Gly Ala Leu Ala Gly Leu Val Leu Ile	
385 390 395	
CTC CTC ATC GGC TAC CTC GTC GGC AGG AAG AGG AGT CAC GCA GGC TAC	1429
Val Leu Ile Ala Tyr Leu Val Gly Arg Lys Arg Ser His Ala Gly Tyr	
400 405 410	
CAG ACT ATC TAGCCTGGTG CACGCAGGCA CAGCAGCTGC AGGGGCTCT	1478
Gln Thr Ile	
415	

FIGURE 13 CONTINUED

【図14】

10 20 30 40 50 60 70  
 \* \* \* \* \*  
 ATGATCACATTCCTGCGCTGCTGCTGGGACTCAGCCTGGGCTGCACAGGAGCAGGTGGCTTCGTGGCCC  
 TACTAGTGTAAAGGACGGCGACGACGACCCCGAGTCGACACCGGACCTGTCTCTCTCACCGAAGCACCGGG  
 M I T F L F L L L G L S L G C T G A G G F V A>

80 90 100 110 120 130 140  
 \* \* \* \* \*  
 ATGTGGAAGACCTGCTGCTGTGGATGATGCTGGGACTCCAAAGGATTTACATACCTGCATCTCTCTTCAA  
 TACACCTTTGCTGGACGACGACCTACTACGACCTGAGGTTTCTCTAAAGTGTATGACCTAGAGGAAGTT  
 H V E S T C L L D D A G T P K D F T Y C I S F N>

150 160 170 180 190 200 210  
 \* \* \* \* \*  
 CAAGGATCTGCTGACTGCTGGGATCCAGGAGGAATAAGATGGCCCTTGCGAATTTGGGGTGCTGAAT  
 GTGCTTAGACGACTGACGACGACCTAGGTCTCCCTTTATCTACCGGGGACGCTTAAACCCGACCTTA  
 K D L L T C W D P E E N K M A P C E F G V L N>

220 230 240 250 260 270 280  
 \* \* \* \* \*  
 AGCTTTGGGCAATGTCTCTTACAGCACCTCCAAACAAAAGACACCTGATGCGACGCTTGCGCAATGGCC  
 TGGAAACCGCTTACAGGAGATGTGCTGGAGTTGGTTTTTCTGTGGGACTACGTCCGGAACCGCTTACCGG  
 S L A N V L S Q R L N Q K D T L M Q R L R N G>

290 300 310 320 330 340 350  
 \* \* \* \* \*  
 TTCGAATTTGTGCCACACACACCCAGCCCTTCTGGGATCACTGACCAACAGGACACGGCCACATCTGT  
 AAGTCTTAAACACGGTGTGTGTGGGTGGGAGACCCCTAGTGACTGGTTGTCTGTGCGGCTGGTAGACA  
 L Q N C A T E T Q P F W G S L T N R T R P P S V>

350 370 380 390 400 410 420  
 \* \* \* \* \*  
 GCAAGTAGCCAAAACCACTCTCTTAAACAGGAGGAGCTGTGATGCTGGCCCTGCTATGTGTGGGGCTTC  
 CGTTCACTCGGTTTTGGTAGGAAATGTGCTCCCTCGGACACTACGACCGGACGATACACACCCCGAGG  
 Q V A K T T F F N T R E F V M L A C Y V W G F>

430 440 450 460 470 480 490  
 \* \* \* \* \*  
 TATCCAGCAGAGTGACTATCACTGGAGGAAGAACGGGAGCTTGTATGCTCTCACAGCACTGCGCACA  
 ATAGTGTGCTCTTCACTGACAGTGACCTCTCTTTCCTCTCGACAGTACGAGTGTGCTCACCGCTGT  
 Y P A E V T I T W R K N G K L V M P H S S A H>

500 510 520 530 540 550 560  
 \* \* \* \* \*  
 AGACTGCCAGCCCAATGGAGACTGGACATACCAGACCTCTCCCAATTAGCCTTAACCCCTCTTACGG  
 TCTGACGGGTCGGGTACCTCTGACCTGTATGGTCTGGGAGAGGGTAAATCGGAATGGGGAGGAATGCC  
 K T A Q P N G D W T Y Q T L S H L A L T F S Y G>

FIGURE 14

【図14-1】

```

      570      580      590      600      610      620      630
      *      *      *      *      *      *      *
GGACACTTACACCTGTCTGGTAGAGCACATCGGGGCTCCTGAGCCCATCCTTCGGGACTGGACACCTGG
CCTGTGAAATGTGGACACACCACTCTGTGTAAACCCGAGGACTCGGGTAGGAAGCCCTGACCTGTGGACCC
D T Y T C V V E H I G A P E P I L R D W T P G>

      640      650      660      670      680      690      700
      *      *      *      *      *      *      *
CTGTCCCCCAIGCAGACCTGAAGGTTCTGTGTCTGCACTGACTCTGGGCTTGGGCTCATCATCTTCT
GACAGGGGGTACCTCTGGGACTTCCAAAGACACAGACCTCACTGAGACCCGGACCCGGAGTAGTAGAAGA
L S P M Q T L K V S V S A V T L G L G L I I F>

      710      720      730      740      750      760      770
      *      *      *      *      *      *      *
CTCTTGGTGTGATCAGCTGGCGGAGAGCTGGCCACTCTAGTTACACTCCTCTTCTGGGTCCAAATTATTC
GAGAACCACACTAGTCTGACCGCTCTCTCGACCGGTGAGATCAATGTGAGGAGAAAGGACCCAGGTTAATAG
S L G V I S W R R A G H S S Y T P L P G S N Y S>

      780      790
      *      *
AGAAGGATGGCACATTTCCTAG
TCTTCTCTACCGTGTAAAGGATC
E G W H I S **

```

FIGURE 14 Continued

【図15】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
ATGGGTTCTGGGTGGGTCCCTCGGTGGGTGGCTCTGCTAGTGAATCTGACCCAACTGGATTCCCTCATGA
TACCCAAGACCCACCCAGGGGAGCCACCAAGAGACGATCACTTAGACTGGGTGACCTAAGGAGGTACT
M G S G N V F W V V A L L V N L T Q L D S S M>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
CTCAGGGCACAGACTCTCCAGAAGATTTTGTGATTGAGGCAAGGCTGACTGTACTTCCACCAAGGAGGAC
GAGTTCCTGTCTGAGAGGTCTTCTAAACACTAAGTCCGTTCGAGCTGACAAAGTGGTTGCTCTG
T Q G T D S P E D F V I Q A K A D C Y F T N G T>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
AGAAAGGTGCAGTTTGTGGTCAAGATTCTTTAACTTGGAGGAGTATGTACGTTTCGACAGTGATGTG
TCTTTTCACGCTCAAAACACCACTCTAAGTAGAATGAACCTCTCTATACATGCAAGCTGTCTACACAG
E K V Q F V V R F I F N L E E Y V R F D S D V>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
GGGATTTTGTGGCATTGACCAAGCTGGGGCAGCCAGATGCTGAGCAGTGGAAACAGCCGGCTGGATCTCT
CCCTCAAAACACCGTAACTGGTTCGACCCCGTGGTCTACGACTCGTCACTTGTGCGCCGACCTCAGAGA
G M F V A L T K L G Q F D A E Q W N S R L D L>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
TGGAGGAGGACAGACAGGCCCGTGGATGGGGTCTGTAGACACACTACAGGCTGGGGCGCACCCCTCACTGT
ACCTCTCTCTGTCTGTCCGACCACTACCCCGAGACATCTGTGTGATGTCCGACCCCGCTGGGAAGTGACA
L E R S R Q A V D G V C R H N Y R L G A P F T V>

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
GGGAGAGAAAGTGCAACAGAGGTGACAGTGTACCCAGAGGAGGACCCCACTCTGTGACCAAGCATAATCTG
CCCTCTTTTACAGTGGTCTCCACTGTGCATAGGCTCTCTCTGGGGTGGAGACGTGGTCTATTAGAC
G R K V Q P E V T V Y P E R T P L L H Q H N L>

      430     440     450     460     470     480     490
      *      *      *      *      *      *      *
CTGCACTGCTCTGTGACAGGCTTCTATCCAGGGGATATCAGATCAAGTGGTTCTGTAATGGGCAGGAGG
GAGCTGACGAGACACTGTCCGAAAGATAGGTCCCTATAGTTCTAGTTCCCAAGGACTTACCCGTCTCTCC
L K C S V T G F Y P G D I K I K W F L N G Q E>

      500     510     520     530     540     550     560
      *      *      *      *      *      *      *

```

FIGURE 15

【図15-1】

```

AGAGAGCTGGGGTCACTGCCACTGGCCCTATCAGGAATGGAGACTGGACCTTTTCAGACTGTGTGATGCT
TCTCTGGACCCCGATACAGGTGACCGGGATAGTCTTACCTCTGACCTCGAAGTCTGACACCACTACGA
E R A G V M S T G P I R N G D W T F Q T V V M L>

      570      580      590      600      610      620      630
      *      *      *      *      *      *      *
AGAAATGACTCCTGAACTTGGACATGTCTACACCTGCCCTGTGATCACTCCAGCCTGCTGAGCCCTGTT
TCTTTACTGAGGACTTGAACCTGTACAGATGTGGACGGAAACAGCTACTGAGGTGCGACGACTCGGGACAA
E M T P E L G H V Y T C L V D H S S L L S P V>

      640      650      660      670      680      690      700
      *      *      *      *      *      *      *
TCTGTGGAGTGGAGAGCTCAGTCTGAATATCTTGGAGAAAGATGCTGAGTGGCATTGCGACCTTCTCTAC
AGACACCTCACCCTCTCGAGTCAGACTTATAGAACCCTTTCTACGACTCACCGTAACGTGGAGGAGATG
S V E W R A Q S E Y S W R K M L S G I A A F L>

      710      720      730      740      750      760      770
      *      *      *      *      *      *      *
TTGGGCTAATCTTCCTTCTGGTGGGAATGCTCATCCAGCTAAGGGCTCAGAAAGGATATGTGAGGAGCGA
AACCAGATTAGAAGGAAGACCAACCTTAGCAGTAGTGGATTCCGAGTCTTTCTATACACTCTCTGCT
L G L I F L L V G I V I Q L R A Q K G Y V R T Q>

      780      790      800      810      820
      *      *      *      *      *
GATGCTGGTAATGAGGTCTCAGAGCTGTTCTGCTCCCTCAGTCATGCTAA
CTACAGACCACTTACTCCAGAGTTCTCGACAAAGAGGAGTCAGTACGATT
M S G N E V S R A V L L P Q S C*>

```

FIGURE 15 CONTINUED



【図16】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
ATGCTGGGGGTCAGGAGTCTCTCAAGCTCTGCTGCCACCATCTTCTCTCTCTCTCTGCTGCTG
TACGGACCCCCAGGTCTCTCAGGAGGTTGAGACGGACGGTGTGTAAGGAGGAGGACGACAGACGAG
M P G G P G V L Q A L P A T I F L L F L L S A>

      80      90      100      110      120      130      140
      *      *      *      *      *      *      *
TCTACTGGGGCCCTGGGTGCCAGGCCCTGTGGATGCACAGGTCCACGATCATTTGATGGTGAGCCTGG
AGATGGACCCGGGACCCACGGTTCGGGACACCTAAGGTTCAGGGTTCGTAGTAATACCACTGGGACCC
V Y L G P G C Q A L W M H K V P A S L M V S L G>

      150      160      170      180      190      200      210
      *      *      *      *      *      *      *
GGAAGACGCCCTCACTTCCAATGCCCCGACAAATAGCAGCAACACGCCACGTCACTGGTGGCGGCTCCTC
CCTTCTGGGGTGAAGGTTACGGGCGTGTATCGTCTGTGTGGGTTCAGTGGACCCACCGCAGGAG
E D A H F C C P H N S S N N A N V T W W R V L>

      220      230      240      250      260      270      280
      *      *      *      *      *      *      *
CATGGCAACTACAGTGGCCCCCTGAGTCTTGGGCCCCGGGCGAGGACCCCAATGGTACGCTGATCATCC
GTACCGTTGATGTGCACCCGGGGACTCAAGAACCCGGGCCCGCTCCTGGGGTTACCATGGCATAGTAGG
H G N Y T W P P E F L G P G E D P N G T L I I>

      290      300      310      320      330      340      350
      *      *      *      *      *      *      *
AGAAGTGTAAACAGAGCCATGCGGGGCATATACGTGTGCGGGTCCAGGAGGCAACGAGTCATACCAGCA
TCTTACACTTGTCTCGGTACCCCGGTATATGACACACGGGCCAGGTCTCCCGTTGCTCAGTATGGTGT
Q N V N K S H G G I Y V C R V Q E G N E S Y Q>

      360      370      380      390      400      410      420
      *      *      *      *      *      *      *
GTCTGCGGCACCTACCTCTGGCGTGCGCCAGCCGCCCGCCCGGCTTCTCTGGACATGGGGAGGGCACC
CAGACCCCGCTGGATGGAGGCGCACGCGGTCCGGCGGGGGTCCGGGAAGGACCTGTACCCCTCTCCGTTG
S C G T Y L R V R Q P P P R P F L D M G E G T>

      430      440      450      460      470      480      490
      *      *      *      *      *      *      *
AAGAACCCAAATCATCACAGCCGAGGGGATCATCTCTGTCTGCGCGGTGGTCCCTGGGACGCTGCTGC
TTCTTGGCTTAGTAGTGTGGCTCCCTAGTAGGAGGACAAAGACGCGCCACCAAGGACCTTGGGACGAG
K N R I I T A E G I I L L F C A V V P G T L L>

```

FIGURE 16

【図16-1】

```

      500      510      520      530      540      550      560
      *      *      *      *      *      *      *
TGTT CAGGAA CCGATGG CAGAAC GAGAGCTCGGTTGGATGCCGGGGATGAATATGAAGATGAAAACCT
ACAAAGTCCTTTTGCTACCGCTTTGCTCTTCGAGCCCAACCTACGGCCCTACTTATACTTCTACTTTTGGAA
L F R K R W Q N E K L G L D A G D E Y E D E N L>

      570      580      590      600      610      620      630
      *      *      *      *      *      *      *
TTATGAAGGCCTGAACCTGGACGACTGCTCCATGTATGAGGACATCTCCCGGGGCTCCAGGGCACCTAC
AATACTTCCGGACTTGGACCTGCTGACGAGGTACATACCTCTGTAGAGGGCCCCGGAGGTCCCGTGGATG
Y E G L N L D D C S M Y E D I S R G L Q G T Y>

      640      650      660      670      680      690      700
      *      *      *      *      *      *      *
CAGGATGTGGGCAAGCCTCAACATAGGAGATGTCCAGCTGGAGAGCCCTGACACCCCTACTCCTGCCAGG
GTCCCTACACCCGTCGGAGTTGTATCCTCTACAGGTGACCTCTTCGGCACTGTGGGGATGAGGACGCTCC
Q D V G S L N I G D V Q L E K F *>

```

FIGURE 16 CONTINUED

【図17】

GAATTCGCG GTGACC ATG GCC AGG CTG GCG TTG TCT CCT GTG CCC AGC Met Ala Arg Leu Ala Leu Ser Pro Val Pro Ser 1 5 10	49
CAC TGG ATG CTG GCG TTG CTG CTG CTG CTC TCA GCT GAG CCA GTA CCA His Trp Met Val Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ala Glu Pro Val Pro 15 20 25	97
GCA GCC AGA TCG GAG GAC CGG TAC CGG AAT CCC AAA GGT AGT GCT TGT Ala Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys 30 35 40	145
TGG CGG ATC TGG CAG AGC CCA GGT TTC ATA GCC AGG AAA CGG CGC TTC Ser Arg Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Arg Phe 45 50 55	193
ACG GTG AAA ATG CAC TGC TAC ATG AAC AGC GCC TCC GGC AAT GTG ACC Thr Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser 60 65 70	241
TGG CTC TGG AAG CAG GAG ATG GAC GAG AAT CCC CAG CAG CTG AAG CTG Trp Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys Leu 80 85 90	289
GAA AAG GGC CGC ATG GAA GAG TCC CAG AAC GAA TCT CTC GCC ACC CTC Glu Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala Thr Leu 95 100 105	337
ACC ATC CAA GGC ATC CGG TTT GAG GAC AAT GGC ATC TAC TTC TGC CAG Thr Ile Gln Gly Ile Arg Phe Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys Gln 110 115 120	385
CAG AAG TGC AAC AAC ACC TCG GAG GTC TAC CAG GGC TGC GGC ACA GAG Gln Lys Cys Asn Asn Thr Ser Glu Val Tyr Gln Gly Cys Gly Thr Glu 125 130 135	433
CTG CGA GTC ATG GGA TTC AGC ACC TTG GCA CAG CTG AAG CAG AGG AAC Leu Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn 140 145 150 155	481
ACG CTG AAG GAT GGT ATC ATC ATG ATC CAG ACG CTG CTG ATC ATC CTC Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu 160 165 170	529

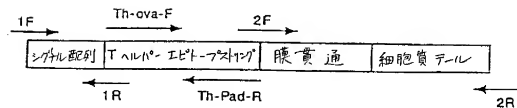
FIGURE 17

## 【図17-1】

TTC ATC ATC GTG CCT ATC TTC CTG CTG CTG GAC AAG GAT GAC AGC AAG	577
Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys	
175 180 185	
GCT GGC ATG GAG GAA GAT CAC ACC TAC GAG GGC CTG GAC ATT GAC CAG	625
Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Glu	
190 195 200	
ACA GGC ACC TAT GAG GAC ATA GTG ACG CTG CGG ACA GGS GAA GTG AAG	673
Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys	
205 210 215	
TGG TCT GTA GGT GAG CAC CCA GGC CAG GAG TGAGAGCCAG GTCCGCCCAT	723
Trp Ser Val Gly Glu His Pro Gly Gln Glu	
220 225 230	

FIGURE 17 CONTINUED

## 【図18】



【図19】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GACGGATCGGGAGATCTCCGGATCCCTATGCTGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCAATGTT
CTGCGTAGCCCTCTAGAGGGCTAGGGGATACCAGCTAGAGTTCATGTTAGACGAGACTACGGCGTATCAA

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
AAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTTGTTGGAGGTGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGGTACA
TTGGGTATAGACGAGGGACCAACACACAACCTCCAGCGACTCATCACGGCTCGTTTAAATTCGATGT

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
ACAAGCCAGGCTTGACCGACAATTCGATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTCGGCTGCTTCGGG
TGTTCGTTCCGAACCTGGCTTTAAGTACTTCTTAGAGGAATCCCATCCGCAAAAGCGAGGACGC

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
ATGTACGGGCCAGATATACGGCTTGACATGATATGACTAGTTATTAAATAGTAATCAATTACGGGGTC
TACATGCCGGTCTATATGGGCACTGTAACTAATACTGATCAATAATTATCATTAGTTAATGCCCCAG

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
ATTAGTTTCATAGCCCATATATGAGTTCCGGGTTACATAACTTAGGGTAAATGGCCGCCCTGGCTGACCG
TAATCAAGTATCGGGTATATACCTCAAGGCGCAATGTATGAATGCCATTACCGGCGGACCGACTGGC

      360     370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *      *
CCCAACGACCCCGGCCCATTTGAGTCAATTAATGACGTATGTTCCCATAGTAAAGCCCAATAGGGACTTTCC
GGGTGCTGGGGGGGGGTAATGCAAGTTATTACTGCATACAAGGGTATCAITGGCGTTATCCCTGAAAGG

      430     440     450     460     470     480     490
      *      *      *      *      *      *      *
ATTGAGCTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC
TAACTGTCAGTTACCCACCTGATAAATGCCATTGACGGGTGAACCGTCATGTAGTTACATAGTATACGG

      500     510     520     530     540     550     560
      *      *      *      *      *      *      *
AAGTACGCCCTATTGACGTCATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTA
TTCATCGGGGGGATAACTGCAGTTACTGCCATTACCGGGCGGACCGTATACGGGTCAATGTACTGGAAAT

      570     580     590     600     610     620     630
      *      *      *      *      *      *      *
TGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTAGGTATTAGTCATCGGTATTACCATGGTGTATGGGTTTGGC
ACCGTGAAAGGATGAACCTCATGTAGATGCATAATCAGTAGGATATGGTACCCTACGCCAAAACCG

      640     650     660     670     680     690     700
      *      *      *      *      *      *      *
AGTACATCAATGGGCGTGGATGCGGTTTGACTACGGGGATTCCCAAGTCTCCACCCGCTTGAAGTCAA
TCATGTAGTTACCGGACCTATGCCAACTGAGTGCCTTAAAGGTTACAGAGGTGGGTAACTGCAAGT

```

FIGURE 19

【図19-1】

```

      713      720      730      740      750      760      770
      *      *      *      *      *      *      *
TGGAGTGTGTTTGGCACAAATCAACGGGACTTCCAAATGTCTAACAACCTCCGCCCATTTGACG
ACCTCTAAACAAACCGTGGTTTAGTTGCTGCTGAAGGTTTACAGCATTTGTGAGCGGGGTAACGCG

      780      790      800      810      820      830      840
      *      *      *      *      *      *      *
CAAAATGGGCGGTAGCGGTGTACGTTGGGAGGTTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGCTAACTAGAGAACCCA
GTTTACCGGCATCCGACATGCCACCTCCAGATATATTGCTCTGAGAGACCGGATGATCTCTTGAGT

      850      860      870      880      890      900      910
      *      *      *      *      *      *      *
CTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGAGAGCCCAAGCTGGCTAGAGTAAGTACCG
GACGAATGACCGAATAGCTTTAATTATGCTGAGTGATATCCCTCTGGGTTGAGCTGATCTCATTCATGGC

      920      930      940      950      960      970      980
      *      *      *      *      *      *      *
CGTATAGAGTCTATAGGCCACCCCTTGCTCTTATGCACTCTATATGTTTGGCTTGGGGTCTAT
GGATATCTCAGATATCCGGGTGGGGGAACCGAAGATACGTACGATATGACAAAAACCGAACCCGATA

      990      1000      1010      1020      1030      1040      1050
      *      *      *      *      *      *      *
ACACCCCGCTTCTCATGTATAGGTGATGGTATAGCTTAGCTTATAGTGTGGGTTATTGACATTAT
TGTGGGGCGAAGAGTACAAATATCCACTACGATATCGAATCGGATATCCACACCGAATACTGGTAATA

      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
      *      *      *      *      *      *      *
TGACCACTCCCTATTGGTGAGGATACCTTCCATTACTAATCCATAACATGGCTCTTTGCCACAACCTTC
ACTGTGAGGGGATAACCACTGCTATGAAGGTATGATTAGTATTGTACCGAGAAACGGTCTTGAGAG

      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190
      *      *      *      *      *      *      *
TTATTGGCTATATGCCAATACACTGTCTTTCAGAGACTGACACGGACTCTGTATTTTACAGGATGGGG
AAATAACCGATATACCGTTAGTGTGACAGGAACTCTGACTGTGCTGAGACATAAAAAATGTCTTACCCC

      1200      1210      1220      1230      1240      1250      1260
      *      *      *      *      *      *      *
TCTCATTTATTTATCAAAATTCACATATACACACACCGTCCCGAGTCCCGGAGTTTATTAAACA
AGAGATAAATAAATGTTTAAATGTATATGTTGGGTGGCAGGGGTCACGGGGCTCAAAATAAATTTGT

      1270      1280      1290      1300      1310      1320      1330
      *      *      *      *      *      *      *
TAACGTGGGATCTCCACCGGAATCTGGGGTACGTGTTCCGACATGGGCTTCTCTCGGTACCGCGGAG
ATTGCACCTTAGAGTGGGCTTAGGCTTCAAGCAAGGCTTTACCGAGAGAGGGCATCGCCGCTTC

      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
      *      *      *      *      *      *      *
CTCTACATCCGAGCCCTGCTCCATGCTCCAGGACTCATGGTGGCTGGGAGCTCTTGTCTTAAC
GAAGATGTAGGCTCGGACGAGGTTACGAGGTGCTGAGTACCGAGGACCGGTGAGGACGAGGATG

```

FIGURE 19 CONTINUED

【図19-2】

```

      1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470
      *          *          *          *          *          *          *
AGTGGAGGCTCAGACTTAGGCAACAGTACGATCCACACCCAGCTGTGCGCACAAAGGCGGTGCGGTA
TCACCTCGGGTCTGAATCCGTGTGCTGTACAGGCTGGTGGTGGTGCACACGGGCGTGTTCGGGCACCGCAT

      1480      1490      1500      1510      1520      1530      1540
      *          *          *          *          *          *          *
GGGTATGTGTCTGAAATGAGCTCGGGGAGCGGGCTTGCAOCTGACGCAATTGGAAGACTTAGGCGAG
CCCATACACAGACTTTTACTCGAGCCCTCGCCGACGTGGCGACTGCGTAAACCTTCTGAATTCGCTC

      1550      1560      1570      1580      1590      1600      1610
      *          *          *          *          *          *          *
CGGCAAGAGAAGATGCAGGCAGCTGAGTTTGTGTCTGATAGAGTCAAGAGTAACTCCGTTGCGGT
GCGCTCTTCTCTACGTCCGTGCACTCAACAACACAGACTATTCTCACTCCATTGAGGGCAACGCCA

      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680
      *          *          *          *          *          *          *
GCTGTTAACCGTGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCTGTGCTGCCGCGCGGCCACACAGACATAAT
CGACAATTGCGACCTGCGCTCACATCAGACTCTCTAGAGCAACGACGGCGCGCGGTGTGTGTTATTA

      1690      1700      1710      1720      1730      1740      1750
      *          *          *          *          *          *          *
AGCTGACAGACTTAACAGACTGTCTCTTCATGGGTCTTTTCTGCAAGCTAGCGGGCTGAATTCGGATA
TCGACTGTCTGATGTCTGACAAAGGAAGGTACCGAAGAAAGACCTCGGATCGGGCGGACTTAAGGCTAT

      1760      1770      1780      1790      1800      1810      1820
      *          *          *          *          *          *          *
TCCAAGCTTGATGAATAAAGATCAGAGCTCTAGTGATCTGTGTGTGGTCTTTTGTGTGTCTGAGCCCC
AGGTTGGAAGTACTTTATTTCTAGTCTCGAGTCACTAGACACAAACCAAAAAACACAGAGCTCGGGG

      1830      1840      1850      1860      1870      1880      1890
      *          *          *          *          *          *          *
AGTGGTCTTTCCGCTCAGAGCCATAGAGCCACCGCATCCCGCATGCTGCTATTGTCTTCCCA
TCGACCAAGAAAGGCGAGTCTTCGGTATCTCGGGTGGGTAGGGGTGTAACGACGATACGAAAGGT

      1900      1910      1920      1930      1940      1950      1960
      *          *          *          *          *          *          *
ATCCTCCCTCTGCTGTCTGCCCCACCCACCCCAAGATAGAAATGACACTACTCAGACAAATGCGAT
TAGAGGGGGGAACGACAGGACCGGGTGGGGTGGGGGTCTTATCTTACTGTGATGAGTCTGTAGGCTA

      1970      1980      1990      2000      2010      2020      2030
      *          *          *          *          *          *          *
GCAATTCCTCATTTTATTAGGAAGGACAGTGGGATGGCACCTTCCAGGGTCAAGGAAGGCAAGGGG
CGTTAAGGAGTAAATAATCCTTCTGTGACCCCTCACCGTGAAGGTCCAGTTCCTTCCTGCCCCC

      2040      2050      2060      2070      2080      2090      2100
      *          *          *          *          *          *          *
AGGGCAACACAGATGCTGGCACTAGAGGCGACAGTCGAGGCTGATCAGCGAGCTCTAGCGGTACC
TCCCGTTGTGTCTACCGACCTTGATCTCCGTGTGAGTCCGACTAGTCCCTCGAGATCGGATG

```

FIGURE 19 CONTINUED

【図19-3】

2110      2120      2130      2140      2150      2160      2170  
 \*      \*      \*      \*      \*      \*      \*  
 GGCAATAGTCTATGGCCGACTCTAGATTCTCTCTTGGGCGCCCTAGATGCAATGCTCGATCGACTTGC  
 CGTAATCAGATACCGGCTGAGATCTAAAGAGGAAACGCGCGGGATCTTACGTACGAGCTAGCTGGAGG  
 2180      2190      2200      2210      2220      2230      2240  
 \*      \*      \*      \*      \*      \*      \*  
 AGTTGGACTGGGAGTGGACACCTGTGGAGGAAAGGCAAGTGGATGTCTATGCTCACTCAAGTGTATGG  
 TCACCTTGGACCTCACCCTGTGGACACCTCTCTTCCGTTTCACTACAGTACAGTGGATGTACATAAC  
 2250      2260      2270      2280      2290      2300      2310  
 \*      \*      \*      \*      \*      \*      \*  
 CCGAGTCTCAAGCCTGCCACACCTCAAGCTAGCTTGGACAAAGAGATTGTCTTTCTGACAGATGGA  
 GGTCTAGAGTTGGAGCGGTGGAGTTGGATTCGACTTGTGTTTCTAACAGAAAGACTGGTCTACCT  
 2320      2330      2340      2350      2360      2370      2380  
 \*      \*      \*      \*      \*      \*      \*  
 CGGCGCCACCTCAAGGCACTCACCGCGGCGAGTGAATATCAATCTCTCTCTGTTTGGAACTGAC  
 GCGCGGTTGGAGTTTCCGTAGTGGCGCCCGGCTCACTTATAGTTTGGAGGAGCAAAACCTTTGACTG  
 2390      2400      2410      2420      2430      2440      2450  
 \*      \*      \*      \*      \*      \*      \*  
 AATCTTAGCGCAGAACTCATGCCCGCTTTTGGAGGGAGTACTCACGCCAACAGCTGGCTCTCGCAGCA  
 TTAGATCGCGTCTTCAGTACGGCGGCAAACTCTCCCTCATGATGGGGTTGTGACCCGGGAGCGTCTGT  
 2460      2470      2480      2490      2500      2510      2520  
 \*      \*      \*      \*      \*      \*      \*  
 GCGAATTAAATCCAGCACACTGGCGGCCCTTACTAGTGGATCCGAGCTCGCAAGCTAGCTTGGGTCTCCC  
 CGCTTAATTAAAGTCTGTGACCGCGCGCAATGATCACTAGGCTCGAGCGTTGATCGAACCAGAGGG  
 2530      2540      2550      2560      2570      2580      2590  
 \*      \*      \*      \*      \*      \*      \*  
 TATAGTGAATCCTATTAACTTCGATAAGCCAGTAAGCACTGGGTCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTGT  
 ATATCACTCAGCAATAATTAAGCTATTCCGTCAATGGTCAACCAAGAGATCAATCGGTCTCTGAGACGA  
 2600      2610      2620      2630      2640      2650      2660  
 \*      \*      \*      \*      \*      \*      \*  
 TATATAGACCTCCACCGTACACGCTACCGCCATTGGTCAATGGCGGGAGTTGTTGACGACATTTT  
 ATATATCTGGAGGTTGGCATGTGCGGATGGCGGGTAAACGAGTTACCCCGCTCAACAATGCTGTAAAA  
 2670      2680      2690      2700      2710      2720      2730  
 \*      \*      \*      \*      \*      \*      \*  
 GGAAGTCCCGTTGACTTTGGTGCAGAAACCAACTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGCTTGGAAATC  
 CTTTTCAGGGCACTAAAGCCACGGTTTGTGAGGCTAACGAGTTACCCACCTCTGAACCTTTAG  
 2740      2750      2760      2770      2780      2790      2800  
 \*      \*      \*      \*      \*      \*      \*  
 CCGGTGAGTCAAAACCGCTATCCACGCCATTGATGTACTGCCAAACCCGATCACCAGTGTAAATAGCAT  
 GGCAGCTGATTTGGCGATAGGTGGCGGTAACTACATGACGGTTTGGCGTAGTGGTACCATTAATGCTA

FIGURE 19 CONTINUED



【図19-4】

2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870  
 \* \* \* \* \*  
 GACATATAGTAGTGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCCATAGGTGATGTACTGGGCATATGCCAGCG  
 CTGATTATGCATCTACATGACGGTTTCATCCTTCAGGGTATTCCAGTACATGACCCGTATTACGGTCCGC  
 2880 2890 2900 2910 2920 2930 2940  
 \* \* \* \* \*  
 GGCATTACCGTCAATTGACGTCAATAGGGGGGTACTTGGCATATGATACACTTGATGTACTGCCAAGT  
 CCGGTAAATGGCAGTAATGCGATTATCCCGCATGAACGGTATATGTGAACTACATGACGGTCA  
 2950 2960 2970 2980 2990 3000 3010  
 \* \* \* \* \*  
 GGCAGTTTACCGTAAATAGTCCAGCCATTGACGTCAATGAAAGTCCCTATTGGCGTTACTATGGGAAC  
 CCGGTCAATGGCATTATGAGTGGGTAACTGCGGTACCTTCAGGGATAACCGCAATGATACCGTTG  
 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080  
 \* \* \* \* \*  
 ATACGTCAATTATGACGTCAATGGCGGGGGTGTGTGGCGGTGAGCGAGCGGCCATTTCACGGTAAGT  
 TATGCGATAATACTGCGATTACCGCGCCCGGACGACCGCCAGTCGGTCCGCGCGGTAAATGGCATCA  
 3090 3100 3110 3120 3130 3140 3150  
 \* \* \* \* \*  
 TATGTAAACGGGAATCCGATATATGGGCTATGAACATGACCGCGTAATTGATTACTTATTAACATAG  
 ATACATTGGCGCTTGAGGTATATACCGGATCTTGATTACTGGGGCATTAACTAATGATAATTATGATC  
 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220  
 \* \* \* \* \*  
 TCAATAATCAATGTCTGTCAATTAATGAAATCGGCCAACCGCGGGAGAGCGGTTTGCGTATTGGCGCT  
 AGTTTATGTTACAGGAGGTAAATTACTTAGCGGTTCGCGCCCTCTCGGCCAAACGCATAACCGCGGA  
 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290  
 \* \* \* \* \*  
 CTTCCGCTTCCTGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTTCGCTCCGCGAGCGGTATCAGCTCACTC  
 GAAGGCGAAGGAGCGAGTGACTGAGCGACGGAGCGACGACGCGCTCGGCTATAGTGGAGTGG  
 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360  
 \* \* \* \* \*  
 AAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAAATCAGGGGATACGCGAGGAAGAAATGTGAGCAAAAGGCCAG  
 TTTCGCCATTATGCCAATAGGTGCTTAACTCCCTGATTGCGTCTCTGTGACACTCGTTTTCGGGTC  
 3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430  
 \* \* \* \* \*  
 CAAGGCGCGAAGAACCTTAAAGAGCGCGGTGCTGGCGTTTTCATAGGCTCCGCGCCCTGACGAGC  
 GTTTCGGGTCTTGCGATTTCCTCGGCGCAACGACGCAAAAGGTATCCGAGCGCGGGGACTGCTCG  
 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500  
 \* \* \* \* \*  
 ATCACAAAATCGAGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCGGACAGGACTATTAAGATACAGGCGGTTTC  
 TAGTGTTTATGCTGGAGTTCAGTCTCCACCGCTTGGGCTGTCTGATATTCTATGTCCTCCGCAAGG

FIGURE 19 CONTINUED

【図19-5】

```

      3510      3520      3530      3540      3550      3560      3570
      *      *      *      *      *      *      *
CCTTGGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTCTGTTCCGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTTC
GGGACCTTCGAGGGGAGCAGCGAGAGGACAAAGGCTGGGACGGCGAATGGCTTATGGACAGCGGAAAGAG

      3580      3590      3600      3610      3620      3630      3640
      *      *      *      *      *      *      *
CCTTGGGAAGCGTGGCTGCTTTCTCAATGCTCAAGCTGTAGGTATCTCAGTTGCGTGTAGTCTGTTCCGT
GGAGCCCTTCGACCGCGAAGAGATTACGAGTCCGACATCCATAGAGTCAAGCCACATCCAGCAGGCGA

      3650      3660      3670      3680      3690      3700      3710
      *      *      *      *      *      *      *
CCAGCTGGGCTGTGTGACGCAACCCCGCTTACGCGCGAGCCGCTTGCGCTTATCCGTAACACTACTGCT
GGTTCGACCCGACACACGCTGCTTGGGGGCGCAAGTCGGCTGCGAGCGCGAATAGGCCATTGATAGCGA

      3720      3730      3740      3750      3760      3770      3780
      *      *      *      *      *      *      *
TGAGTCAACCCGGTAAGACACGACTTATGCGCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGG
ACTCAAGTTGGGCCATTCTGTGCTGAATAGCGGTGACCGTCTGTCGTGACCAITGTCCTAATCGTCTCGC

      3790      3800      3810      3820      3830      3840      3850
      *      *      *      *      *      *      *
AGGTATGTAGGGGCTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGTGTGGCTTAAGTACGGCTACACTAGAGAGCAGTAT
TGCATACATCCGCGACGATGTCTCAAGAACTTACCGACCGGATTGATGCGGATGTGATCTCTGCTGATATA

      3860      3870      3880      3890      3900      3910      3920
      *      *      *      *      *      *      *
TTGTGATCTCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTGGGAAAAAGAGTTGTAGCTCTTGATCCGGCAAAAC
AAGCATAGACGCGAGACGACTTCGGTCAATGGGAAGCCTTTTCTCAACGATCGAGAAGTAGGCCGTTTGT

      3930      3940      3950      3960      3970      3980      3990
      *      *      *      *      *      *      *
AACCACCCCTGGTAGCGGTGTTTCTTTGTTTGGCAAGCAGAGATTACGCCGAGAAAAAGGATCTCAAA
TTGGTGGCGACCATCGGCACCAAAAAACAAAGCTTCGTCTCAATGGCGCTCTTTTCTCTAGAGTT

      4000      4010      4020      4030      4040      4050      4060
      *      *      *      *      *      *      *
GAAGATCCTTTGATCTTTTACGGGCTGTGACCTCAGTGGAAAGAAACTCAGCTTAAGGGATTTTGG
CTTCTAGGAAACTAGAAAAGATGGCCGAGACTGCGATCACTTGTCTTTGAGTGAATCCCTAAAGCC

      4070      4080      4090      4100      4110      4120      4130
      *      *      *      *      *      *      *
TCATGAACAAATAAACTGCTCTTACATAAAGTAATAACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGG
AGTACTTGTATTCTTGACAGACGAATGTATTGTGATTATGTTCCCAACAATACTGGGTATAGTTGCCC

      4140      4150      4160      4170      4180      4190      4200
      *      *      *      *      *      *      *
AAAGGTCTTGCTGAGGCCCGGATAAATTTCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCG
TTTGAGAAAGAGCTCGGCGCTAAATTTAAGGTGTGACTACGACTAAATATACCAATATTACCCGAGC

```

FIGURE 19 CONTINUED

【図19-6】

```

      4210      4220      4230      4240      4250      4260      4270
      *      *      *      *      *      *      *
CGATTAATGTCGGGCAATCAGGTGGGACAACTCTATCGATTGTATGGGAAGCCGATGCCCGCAGAGTGTGTT
GCTATTACAGCCCGCTTAGTCCACCGCTGTAGATAGCTAAACATACCCCTTCGGGCTACCGCGGTCTCAACGAA

      4280      4290      4300      4310      4320      4330      4340
      *      *      *      *      *      *      *
CTGAACATGCGAAAGGTAGCGTGGCCAAATGATGTACAGATGAGATGTCAGACTAAACTGGCTGACAGG
GACTTTGTACCGTTTCCATCGCAAGGTCTACTACAATGCTCTACTACCAAGTCTGATTTGACCGACTGCCC

      4350      4360      4370      4380      4390      4400      4410
      *      *      *      *      *      *      *
AAATTATGCTCTTCGGACCATCAAGCATTTTATCGCTACTCGGTGATGTCATGGTCTACTCACCACTGC
TTAAATACGGAGGAGGCTGGTAGTTGCTAAATAGGCATGAGGACTACTACGTACCAATGAGTGGTGAGG

      4420      4430      4440      4450      4460      4470      4480
      *      *      *      *      *      *      *
GATCCCGCGGAAACAGCATTCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAATATTTGTGTAGCG
CTAGGGGCCCTTTTGTGTAAGGTCCATAATCTTCTATAGGACTAAGTCCACTTTTATAACAACACTGCG

      4490      4500      4510      4520      4530      4540      4550
      *      *      *      *      *      *      *
CTGGCAGTGTTCCTGGCGCCGGTGGCATTGGATTCTGTGTTGTAATGTCTCTTTAACAGCGGATCGGTAT
GACCTTCACAAGGACGGCGCCAAACGTATAGCTAAGGACAAACATTAAACGGAAATTTGTGCTAGCGCAT

      4560      4570      4580      4590      4600      4610      4620
      *      *      *      *      *      *      *
TTGCTCTGCTCAGGCGCAATCGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTGATGACGAGCG
AAGCAGAGCGAGTCCGCGTTAGTGTCTTACTTATGCCAAGCACTACGCTCAGTAAACACTACTGCTGCG

      4630      4640      4650      4660      4670      4680      4690
      *      *      *      *      *      *      *
TAATGCTGCGCCTGTGAAACAGTCTGGAAGAAATGCAATAACTTTGGCCATTCTCACCGGATTCAGTC
ATTACCGACCGGACAACTTGTTCAGACCTTTCTTTACGTATTTGAAACGGTAAGAGTGGCTAAGTCAAG

      4700      4710      4720      4730      4740      4750      4760
      *      *      *      *      *      *      *
GTCACTCATGGTGATTCTCACTTGATAACCTTATTTTGGACGAGGGAATTAAGGTTGTATTGAGG
CASTGAGTACCCTAAGAGGTGAACATTGGAATGAAGTCTGCTCCCTTTAATATCCAACTAACTAC

      4770      4780      4790      4800      4810      4820      4830
      *      *      *      *      *      *      *
TTGACGAGTGGGAATCGCAGACCGATACAGGATCTGGCATGCTATGGAACGCTCGGTGAGTTTC
AACCCTGCTCAGCCTTAGCGTCTGGCTATGGTCTAGAACGGTAGGATACCTTGACGGAGCCACTCAAAAG

      4840      4850      4860      4870      4880      4890      4900
      *      *      *      *      *      *      *
TCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTCAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATTAATTCAGTTT
AGGAAGTAATGTCTTTGCCGAAAGGTTTATACCAATAACTATGAGACTACTATTTCACGCTCAA

```

FIGURE 19 CONTINUED

【図19-7】

```

      4910      4920      4930      4940      4950      4960      4970
      *      *      *      *      *      *      *
      CATTGGATGCTCGATGAGTTTTCCTAATCAGAAATGGTTAATTGGTTCTAACACTGGCAGAGCATCATGA
      GTAAACTACGAGCTACTCAAAAGATTAGTCTTAAGCAATTAAAGCAACATTGTGACCGTCTCGTAGTACT

      4980      4990      5000      5010      5020      5030      5040
      *      *      *      *      *      *      *
      GCGGATACATATTGGAATGTATTAGAAAAATAAACAATAAGGGTTCCGCGGCACATTCCCGGAAAAAT
      CGCCTATGTATAAAGTTACATAAAATCTTTTATTGTTTATCCCTAAGGCGCGTGTAAAGGGGCTTTTCA

      5050
      *
      GCCACCTGACGTC
      CGGTGCACTGCAG

```

FIGURE 19 CONTINUED

【図20】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCTAGCGCCGCCCATGGGAATGCAGGTGCAGATCCAGAGCCTGTTCTGCTCCTCTGTGGGTGCCCG
CGATCGCGGCGGTGTACCTTACGTCCACGTCTAGGTCTCGGACAAAGACGAGGAGGACACCCACGGGC
      M G M Q V Q I Q S L F L L L L W V P>

      80      90      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *      *      *
GGTCAGAGGACACACCCCTGTGGAGGCGGAAATCCTGTATAAGGCCAAGITCGTGCTGCTGCTGACCT
CCAGGTCTCCTGTGTGGGACACCTTCCGGCCTTAGGACATATTCGGTTCAAGCACGACCGACCTGGGA
G S R G H T L W K A G I L Y K A K F V A A W T L>

      150     160     170     180     190     200     210
      *      *      *      *      *      *      *
GAAGGCTGCCGCTTTCCTGCTTAGCGATTTCCTTCCTAGCGTGAAGCTGACCCCACTGTGCGTGACCTG
CTTCGACGCGGAAAGGACGGATCGCTAAGAAAGGATCGCACTTCGACTGGGGTGACACGCACTGGGAC
K A A A F L P S D F F P S V K L T P L C V T L>

      220     230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *      *      *
TATATGGATGACGTGGTGTGGGAGCCAGCATCATCACTTCGAGAAGCTGGACTGTCCAGATACGTGG
ATATACCTACTGCACACGACCTCTCGGTCTGTAGTATTGAAGCTCTTCGACCTTGACAGGTCTATGCACC
Y M D D V V L G A S I I N F E K L G L S R Y V>

      290     300     310     320     330     340     350
      *      *      *      *      *      *      *
CTAGGCTGATCTGGAAGGAGCCTGTGCACGGCGGTGCCACCTGCCAGAGACCAACCTGTGTGAGGAGGAC
GATCCGCACTAGGACTTCTCTCGGACACGTGCCGACAGGTGGGACGGTCTCTGTGTGGCACCCTCCTCTGT
A R L I L K E P V H G V S T L P E T T V V R R T>

      360     370     380     390     400     410
      *      *      *      *      *      *
CGTGCTACTATGGAGTGCCTGTGGAAGTGGCTGAGCCTGCTGGTGCCCTTTGTGGGTACC
GCACATGATACCTCACGGACACACCTTCACCGACTCGGACGACACCGGGAAACACCCATGG
V Y Y G V P V W K W L S L L V P F V G T>

```

FIGURE 20

【図21】

```

10      20      30      40      50      60      70
* * * * *
GCTACGCGCCCAACCATGGGAATGCAAGTGCAGATCCAGAGCCTGTTCTGCTCCTCTGTGGTGCCCG
CBAATCGCGCGGTGTGTACCTTACGTCCACGTCTAGGTCTCTGACAAAGACGAGGAGGACACCCACGCGG
      M G M Q V Q I Q S L F L L L L W V P>

      80      90      100      110      120      130      140
* * * * *
GGTCCAGAGGACACACCTGTGGAAGGCCGGAATCCTGTATAAGGCCAAGTTCGTGGCTGCTCGAGACCT
CCAGGTCTCTGTGTGGGACACCTTCCGGCCTTAGGACATATTCGGTTCAAGCACCGACGACCTGGGA
G S R G H T L W K A G I L Y K A K F V A A W T L>

      150      160      170      180      190      200      210
* * * * *
GAAGGCTGCCGCTTTCCTGCTAGCGAATTTCCTTCTAGCGTGAAGCTGACCCCACTGTGCGTGACCCCTG
CTTCGACGCGCGAAGGACGAGATGCTAAAGAAAGGATGCACTTCGACTGGGCTGACACGCACCTGGGAC
K A A A F L P S D F F P S V K L T F L C V T L>

      220      230      240      250      260      270      280
* * * * *
TATATGGATGACGTGTGCTGGAGTGGGACTGTCAGGTACGTGGCTAGGCTGATCCTGAAGGACCTTG
ATATACCTTACTGCACCAACGACCTTCACCCCTGACAGGTCCATGCACCGATCCGACTAGGACTTCCTGGAG
Y M D D V V L G V G L S R Y V A R L I L K E P>

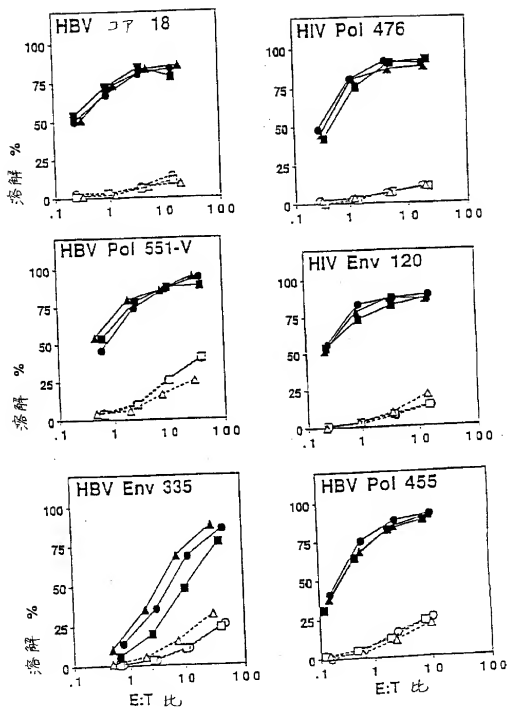
      290      300      310      320      330      340      350
* * * * *
TGCACGCGTGTGCCACCTGCGCAGAGCACACCTGTGTGAGGAGGACCGTGTACTATGGAGTGCCCTGTG
ACGTGCCGCACAGGTGGAGCGTCTCTGTGGCACCACCTCTCTGTGGCACATGATACCTCACGGACACAC
V H G V S T L P E T T V V R R T V Y Y G V P V W>

      360      370      380      390
* * * * *
GAAGTGGCTGACCTGCTGTGCTGCTTGTGTGAGGTAC
CTTCACCGACTCGGACGACCAAGGAAACACACTCCATGG
      K W L S L L V P F V =>

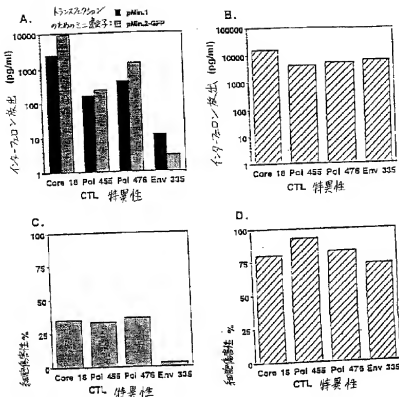
```

FIGURE 21

【図22】

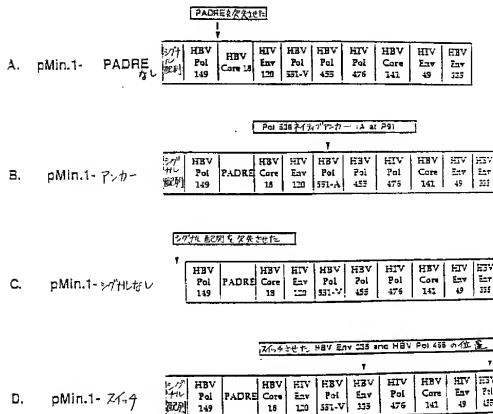


【図23】

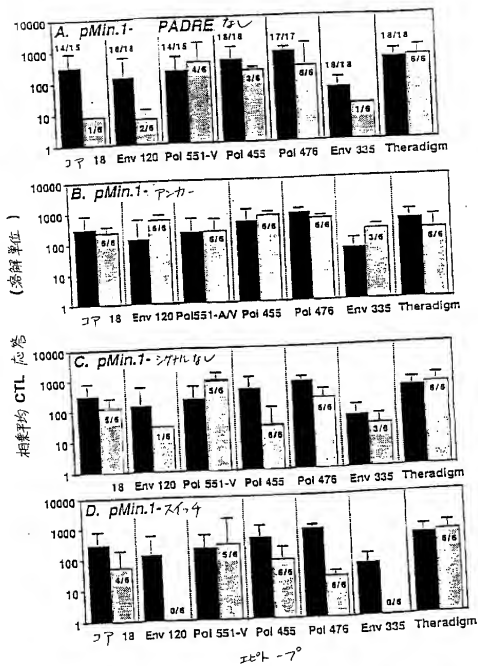




【図24】



【図25】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.  
PCT/US 99/10646

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/85		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Medium: documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 35021 A (US HEALTH ;ZAREMBA SAM (US); SCHLOM JEFFREY (US); TSANG KWONG YOK) 25 September 1997 (1997-09-25)	1,3,5, 10,16, 20,22, 27,35, 37,38, 41,48, 49,52, 53,56,64
Y	page 7, line 7 - line 13; claim 35  page 13, line 24 - line 31 ---	2-9, 11-17, 19-26, 28-34, 36-48, 42-64
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" inter document published after the international filing date on priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search: 18 February 2000		Date of mailing of the international search report: 03.03.00
Name and mailing address of the ISA: European Patent Office, P.O. Box 1601 NL - 1200 AD Rijswijk Tel. (+31-70) 3402049, Te. 21 651400 nL Fax: (+31-70) 3402019		Authorized officer: Spirks, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.  
PCT/US 99/19546

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	THOMSON ET AL.: "Targeting a polypeptide protein incorporating multiple class II-restricted viral epitopes to the secretory/endocytic pathway facilitates immune recognition by CD4+ cytotoxic T lymphocytes: a novel approach to vaccine design." JOURNAL OF VIROLOGY (ONLINE), vol. 72, no. 3, March 1998 (1998-03), pages 2246-2252, XP002130251 cited in the application	1,2,13, 18,19, 30,35, 36,44
Y	abstract; figures 1-5; table 1	2-17, 19-34, 36-64
Y	--- WO 95 07767 A (CYTEL CORP) 23 March 1995 (1995-03-23) page 5, line 10	8,9,25, 26,39, 40,54,55
Y	--- WO 95 22317 A (CYTEL CORP) 24 August 1995 (1995-08-24) page 17 page 23 page 25 page 26 page 28	10-12, 27-29, 41-43, 56-58
X	--- AN ET AL.: "A multivalent minigene vaccine, containing B-cell, cytotoxic T-lymphocyte, and Th epitopes from several microbes, induces appropriate responses in vivo and confers protection against more than one pathogen." JOURNAL OF VIROLOGY (ONLINE), vol. 71, no. 3, March 1997 (1997-03), pages 2292-2302, XP002130252 cited in the application	48,49
A	abstract	1-47, 50-64
A	--- WO 97 41227 A (T CELL SCIENCES INC ;THOMAS LAWRENCE J (US)) 6 November 1997 (1997-11-06) page 13 -page 14	1-64
A	--- US 5 633 234 A (AUGUST J THOMAS ET AL) 27 May 1997 (1997-05-27) cited in the application abstract; claim 15	1-64
	--- -/-	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.  
PCT/US 99/10646

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of its relevant passages	Reference to claim No.
A	ULMER ET AL.: "Presentation of an exogenous antigen by major histocompatibility complex class I molecules." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 24, no. 7, July 1994 (1994-07), pages 1596-1596, XP002130253 the whole document	13,30, 44,59
P,X	ISHIOKA ET AL.: "Utilization of MHC class I transgenic mice for development of minigene DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes." THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 162, no. 7, 1 April 1999 (1999-04-01), pages 3915-3925, XP000872894 the whole document	1-64

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 99/10646**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 18-47 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Appl. No.

PCT/US 99/10646

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9735021 A	25-09-1997	AU 2535997 A EP 0886456 A	10-10-1997 07-01-1999
WO 9507707 A	23-03-1995	AU 698962 B AU 7873694 A CN 1135181 A EP 0735693 A JP 9505559 T US 5736142 A	12-11-1998 03-04-1995 06-11-1996 09-10-1996 03-06-1997 07-04-1998
WO 9522317 A	24-08-1995	AU 1847395 A AU 2500499 A CA 2183416 A EP 0804158 A	04-09-1995 24-06-1999 24-08-1995 05-11-1997
WO 9741227 A	06-11-1997	AU 2994687 A CA 2258428 A EP 0914427 A	19-11-1997 06-11-1997 12-05-1999
US 5633234 A	27-05-1997	AT 180835 T CA 2154445 A DE 69418856 D DE 59418856 T EP 0680513 A ES 2132395 T JP 9505078 T WO 9417192 A	15-06-1999 04-08-1994 08-07-1999 28-01-2000 08-11-1995 16-08-1999 25-06-1996 04-08-1994

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	キーワード (参考)
A 6 1 K	39/29	A 6 1 P	31/14
A 6 1 P	31/14		31/16
	31/16		31/20
	31/20		37/02
	37/02	C 1 2 N	15/00
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, B J, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), E A(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, G E, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, I S, J P, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, M N, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, Z W		Z N A A
(72)発明者	セツト, アレサンドロ アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037, ラ ホヤ, リンダ ローザ アベニュー 5551		
(72)発明者	イシオカ, グレン ワイ, アメリカ合衆国 カリフォルニア 92075, ソラナ ビーチ, サウス ナード アベニュー 725, アpartment ジェイ5		
(72)発明者	リビングストン, ブライアン アメリカ合衆国 カリフォルニア 92129, サン ディエゴ, チャコ コート 13555		
(72)発明者	チェスナット, ロバート ダブリュー, アメリカ合衆国 カリフォルニア 92007, カーディフバイザーシー, キングス クロス ドライブ 1473		
F ターム (参考)	4B024 AA11 AA20 BA31 FA02 4C085 AA03 AA14 BA51 BA69 BA87 BA89 CC04 DD23 DD62 4C086 AA01 AA02 FA16 MA01 MA04 NA14 ZA75 ZB11		



【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成17年4月21日(2005.4.21)

【公表番号】特表2002-520000(P2002-520000A)

【公表日】平成14年7月9日(2002.7.9)

【出願番号】特願2000-548449(P2000-548449)

【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 15/09

A 6 1 K 31/711

A 6 1 K 39/00

A 6 1 K 39/12

A 6 1 K 39/21

A 6 1 K 39/29

A 6 1 P 31/14

A 6 1 P 31/16

A 6 1 P 31/20

A 6 1 P 37/02

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 31/711

A 6 1 K 39/00 H

A 6 1 K 39/12

A 6 1 K 39/21

A 6 1 K 39/29

A 6 1 P 31/14

A 6 1 P 31/16

A 6 1 P 31/20

A 6 1 P 37/02

【手続補正書】

【提出日】平成15年6月20日(2003.6.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

主要組織適合性(MHC)標的化配列をコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターであって、該第1のヌクレオチド配列は2つ以上の異種ペプチドエпитープをコードする第2のヌクレオチド配列に融合され、ここで該異種ペプチドエпитープは、2つのHTLペプチドエпитープまたはCTLペプチドエпитープおよびユニバーサルHTLペプチドエпитープを含む、ベクター。

【請求項2】

前記異種ペプチドエпитープが2つ以上の異種HTLペプチドエпитープを含む、請求項1に記載の発現ベクター。

【請求項3】

前記異種ペプチドエпитープがCTLペプチドエпитープおよびユニバーサルHTLペプチドエпитープを含む、請求項1に記載の発現ベクター。

## 【請求項4】

前記異種ペプチドエピトープがさらに1つ以上のCTLペプチドエピトープを含む、請求項2に記載の発現ベクター。

## 【請求項5】

前記異種ペプチドエピトープがさらに2つ以上のCTLペプチドエピトープを含む、請求項3に記載の発現ベクター。

## 【請求項6】

前記異種ペプチドエピトープがさらに2つ以上のHTLペプチドエピトープを含む、請求項3に記載の発現ベクター。

## 【請求項7】

前記HTLペプチドエピトープの1つがユニバーサルHTLエピトープである、請求項2に記載の発現ベクター。

## 【請求項8】

前記ユニバーサルHTLエピトープが汎DRエピトープである、請求項3または7に記載の発現ベクター。

## 【請求項9】

前記汎DRエピトープが、配列AlaLysPheValAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla（配列番号38）を有する、請求項8に記載の発現ベクター。

## 【請求項10】

前記ペプチドエピトープが、B型肝炎ウイルスエピトープ、C型肝炎ウイルスエピトープ、ヒト免疫不全ウイルスエピトープ、ヒトパピローマウイルスエピトープ、MAGEエピトープ、PSAエピトープ、PSMエピトープ、PAPエピトープ、p53エピトープ、CEAエピトープ、Her2/neuエピトープ、またはPlasmodiumエピトープである、請求項1に記載の発現ベクター。

## 【請求項11】

前記ペプチドエピトープが表1～8に表されるペプチドからなる群より選択される配列を各々有する、請求項10に記載の発現ベクター。

## 【請求項12】

少なくとも1つの前記ペプチドエピトープが、表1～8に示されるペプチドのアナログである、請求項11に記載の発現ベクター。

## 【請求項13】

前記MHC標的化配列が、I iタンパク質、LAMP-I、HLA-DM、HLA-DO、H2-DO、インフルエンザマトリックスタンパク質、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルスコア抗原、Ty粒子、Ig- $\alpha$ タンパク質、Ig- $\beta$ タンパク質、およびIg $\kappa$ 鎖シグナル配列からなる群より選択されるポリペプチドの一領域を含む、請求項1に記載の発現ベクター。

## 【請求項14】

前記発現ベクターが、第2のプロモーター配列をさらに含み、該プロモーター配列は1つ以上の異種HTLペプチドエピトープまたは異種CTLペプチドエピトープをコードする第3のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項1に記載の発現ベクター。

## 【請求項15】

前記ベクターがpMin1またはpEP2を含む、請求項1に記載の発現ベクター。

## 【請求項16】

前記CTLペプチドエピトープが、HLAスーパータイプについての構造モチーフを含み、それによって該CTLペプチドエピトープは、500nMより大きいアフィニティーで該スーパータイプの2つ以上のメンバーに結合する、請求項3または4に記載の発現ベクター。

## 【請求項17】

前記CTLペプチドエピトープが、1つより多くのHLA対立遺伝子スーパータイプにつ

いての結合アフィニティーを提供する構造モチーフを有する、請求項4または5に記載の発現ベクター。

【請求項18】

哺乳動物被験体においてインビボで免疫応答を誘導するための組成物であって、該組成物は以下：

主要組織適合性（MHC）標的化配列をコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターであって、該第1のヌクレオチド配列は2つ以上の異種ペプチドエпитープをコードする第2のヌクレオチド配列に融合され、ここで該異種ペプチドエпитープは、2つのHTLペプチドエпитープまたはCTLペプチドエпитープおよびユニバーサルHTLペプチドエпитープを含む、ベクターを含む、組成物。

【請求項19】

前記異種ペプチドエпитープが2つ以上の異種HTLペプチドエпитープを含む、請求項18に記載の組成物。

【請求項20】

前記異種ペプチドエпитープがCTLペプチドエпитープおよびユニバーサルHTLペプチドエпитープを含む、請求項18に記載の組成物。

【請求項21】

前記異種ペプチドエпитープがさらに1つ以上のCTLペプチドエпитープを含む、請求項19に記載の組成物。

【請求項22】

前記異種ペプチドエпитープがさらに2つ以上のCTLペプチドエпитープを含む、請求項20に記載の組成物。

【請求項23】

前記異種ペプチドエпитープがさらに2つ以上のHTLペプチドエпитープを含む、請求項20に記載の組成物。

【請求項24】

前記HTLペプチドエпитープがユニバーサルHTLエпитープである、請求項19に記載の組成物。

【請求項25】

前記ユニバーサルHTLエпитープが汎DRエпитープである、請求項20または24に記載の組成物。

【請求項26】

前記汎DRエпитープが、配列AlaLysPheValAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla（配列番号38）を有する、請求項25に記載の組成物。

【請求項27】

前記ペプチドエпитープが、B型肝炎ウイルスエпитープ、C型肝炎ウイルスエпитープ、ヒト免疫不全ウイルスエпитープ、ヒトパピローマウイルスエпитープ、MAGEエпитープ、PSAエпитープ、PAPエпитープ、PSMエпитープ、p53エпитープ、CEAエпитープ、Her2/neuエпитープ、またはPlasmodiumエпитープである、請求項18に記載の組成物。

【請求項28】

前記ペプチドエпитープが表1～8に表されるペプチドからなる群より選択される配列を各々有する、請求項27に記載の組成物。

【請求項29】

少なくとも1つの前記ペプチドエпитープが、表1～8に表されるペプチドのアナログである、請求項28に記載の組成物。

【請求項30】

前記MHC標的化配列が、I i タンパク質、LAMP-I、HLS-DM、HLA-DO、H2-DO、インフルエンザマトリックスタンパク質、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウ

イルスコア抗原、T y 粒子、I g- $\alpha$ タンパク質、I g- $\beta$ タンパク質、およびI g- $\kappa$ 鎖シグナル配列からなる群より選択されるポリペプチドの一領域を含む、請求項18に記載の組成物。

【請求項31】

前記発現ベクターが、第2のプロモーター配列をさらに含み、該プロモーター配列は1つ以上の異種HTLペプチドエпитープまたは異種CTLペプチドエпитープをコードする第3のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項18に記載の組成物。

【請求項32】

前記ベクターがpMin、1またはpEP2を含む、請求項18に記載の組成物。

【請求項33】

前記CTLペプチドエпитープが、HLAスーパータイプについての構造モチーフを含み、それによって該ペプチドエпитープは、500nMより大きいアフィニティで該スーパータイプの2つ以上のメンバーに結合する、請求項20または21に記載の組成物。

【請求項34】

前記CTLペプチドエпитープが、1つより多くのHLA対立遺伝子スーパータイプについての結合アフィニティを提供する構造モチーフを有する、請求項21または22に記載の組成物。

【請求項35】

哺乳動物被験体においてインビボで免疫応答を誘導するための組成物であって、該組成物は、以下：

主要組織適合性(MHC)標的化配列をコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターであって、該第1のヌクレオチド配列は、異種ヒトHTLペプチドエпитープをコードする第2のヌクレオチド配列に融合されている、ベクター

を含む、組成物。

【請求項36】

前記第2のヌクレオチド配列がさらに2つ以上の異種HTLペプチドエпитープを含む、請求項35に記載の組成物。

【請求項37】

前記第2のヌクレオチド配列がさらに1つ以上の異種CTLペプチドエпитープを含む、請求項35に記載の組成物。

【請求項38】

前記HTLペプチドエпитープがユニバーサルHTLペプチドエпитープである、請求項35に記載の組成物。

【請求項39】

前記ユニバーサルHTLエイトープが汎DRエイトープである、請求項38に記載の組成物。

【請求項40】

前記汎DRエイトープが、配列AlaLysPheValAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla(配列番号38)を有する、請求項39に記載の組成物。

【請求項41】

前記HTLペプチドエイトープおよびCTLペプチドエイトープが、B型肝炎ウイルスエイトープ、C型肝炎ウイルスエイトープ、ヒト免疫不全ウイルスエイトープ、ヒトパピロームウイルスエイトープ、MAGEエイトープ、PSAエイトープ、PAPエイトープ、PSMエイトープ、p53エイトープ、CEAエイトープ、Her2/neuエイトープ、またはPlasmodiumエイトープである、請求項37に記載の組成物。

【請求項42】

前記ペプチドエイトープが表1～8に表されるペプチドからなる群より選択される配列を各有する、請求項41に記載の組成物。

【請求項43】

少なくとも1つの前記ペプチドエпитープが、表1～8に表されるペプチドのアナログである、請求項42に記載の組成物。

【請求項44】

前記MHC標的化配列が、I i タンパク質、LAMP-I、HLS-DM、HLA-DO、H2-DO、インフルエンザマトリックスタンパク質、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルスコア抗原、Ty粒子、I g- $\alpha$ タンパク質、I g- $\beta$ タンパク質、およびI g $\kappa$ 鎖シグナル配列からなる群より選択されるポリペプチドの一領域を含む、請求項35に記載の組成物。

【請求項45】

前記発現ベクターが、第2のプロモーター配列をさらに含み、該プロモーター配列は1つ以上の異種HTLペプチドエпитープまたは異種CTLペプチドエпитープをコードする第3のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項35に記載の組成物。

【請求項46】

前記CTLペプチドエпитープが、HLAスーパータイプについての構造モチーフを含み、それによって該ペプチドエпитープは、500nMより大きいアフィニティーで該スーパータイプの2つ以上のメンバーに結合する、請求項37に記載の組成物。

【請求項47】

前記CTLペプチドエпитープが、1つより多くのHLA対立遺伝子スーパータイプについての結合アフィニティーを提供する構造モチーフを有する、請求項37に記載の組成物。

【請求項48】

非ヒト哺乳動物においてインビボでヒトT細胞ペプチドエпитープのヒトの免疫原性をアッセイする方法であって、該方法は、異種ヒトCTLペプチドエпитープまたは異種ヒトHTLペプチドエпитープをコードする第1のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクターを、該非ヒト哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項49】

前記第1のヌクレオチド配列が2つ以上の異種CTLペプチドエпитープまたは異種HTLペプチドエпитープをコードする、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

前記非ヒト哺乳動物が、ヒトHLA対立遺伝子を発現するトランスジェニックマウスである、請求項48に記載の方法。

【請求項51】

前記ヒトHLA対立遺伝子がA11およびA2.1からなる群より選択される、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

前記発現ベクターが、主要組織適合性(MHC)標的化配列をコードする第2のヌクレオチド配列をさらに含む、請求項48に記載の方法。

【請求項53】

前記HTLペプチドエпитープがユニバーサルHTLエпитープである、請求項48に記載の方法。

【請求項54】

前記ユニバーサルHTLエпитープが汎DRエпитープである、請求項53に記載の方法。

【請求項55】

前記汎DRエпитープが、配列AlaLysPheValAlaAlaTrpThrLeuLysAlaAlaAla(配列番号38)を有する、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

前記CTLペプチドエпитープまたはHTLペプチドエпитープが、B型肝炎ウイルスエпитープ、C型肝炎ウイルスエпитープ、ヒト免疫不全ウイルスエпитープ、ヒトパピロ

ーマウイルスエпитープ、MAGEエпитープ、PSAエпитープ、PSMエпитープ、PAPエпитープ、p53エпитープ、CEAエпитープ、Her2/neuエпитープ、またはPlasmodiumエпитープである、請求項48に記載の方法。

【請求項57】

前記CTLペプチドエпитープまたはHTLペプチドエпитープが表1～8に表されるペプチドからなる群より選択される配列を各々有する、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

少なくとも1つの前記ペプチドエпитープが、表1～8に表されるペプチドのアナログである、請求項57に記載の方法。

【請求項59】

前記MHC標的化配列が、I iタンパク質、LAMP-I、HLS-DM、HLA-DO、H2-DO、インフルエンザ、B型肝炎ウイルスコア抗原、Ty粒子、I g- $\alpha$ タンパク質、I g- $\beta$ タンパク質、およびI g $\kappa$ 鎖シグナル配列からなる群より選択されるポリペプチドの一領域を含む、請求項52に記載の方法。

【請求項60】

前記発現ベクターが、第2のプロモーター配列をさらに含み、該プロモーター配列は1つ以上の異種ヒトCTLペプチドエпитープまたは異種ヒトHTLペプチドエпитープをコードする第3のヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項48に記載の方法。

【請求項61】

前記ベクターがpMin.1またはpEP2を含む、請求項48に記載の方法。

【請求項62】

前記CTLペプチドエпитープが、HLA対立遺伝子スーパータイプについての結合アフィニティを提供する構造モチーフを有する、請求項48に記載の方法。

【請求項63】

前記CTLペプチドエпитープが、1つより多くのHLA対立遺伝子スーパータイプについての結合アフィニティを提供する構造モチーフを有する、請求項49に記載の方法。

【請求項64】

前記発現ベクターが、HTLペプチドエпитープおよびCTLペプチドエпитープの両方を含む、請求項48に記載の方法。